

Untersuchung zum Vorkommen des Frühsommer-Meningo-
Enzephalitis-Virus und *Borrelia burgdorferi* in ausgewählten
Wildmaus-und Zeckenpopulationen Bayerns

Judith Rabea Kießling

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. O.-R. Kaaden

**Untersuchung zum Vorkommen
des Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus und *Borrelia burgdorferi*
in ausgewählten Wildmaus- und Zeckenpopulationen Bayerns**

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

von
Judith Rabea Kießling
aus Memmingen

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. O.-R. Kaaden
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. C. Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Meinen Eltern

Parturient montes, nascetur ridiculus mus.

(Horaz, Ars poetica, Vers 139)

Inhaltsverzeichnis

0.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	VI
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1.	Bedeutung der Lyme Borreliose und der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)	2
2.2.	Erreger-Vektor-Wirt-Interaktion	7
2.2.1.	<i>Ixodes ricinus</i> als Vektor	8
2.2.2.	Mäuse als Reservoirwirt	11
2.3.	Borrelien	13
2.3.1.	Taxonomie	13
2.3.2.	Morphologie	14
2.3.3.	Genomaufbau	15
2.3.4.	Oberflächenproteine von <i>Borrelia burgdorferi</i>	16
2.3.5.	Erkrankung des Menschen mit Lyme Borreliose	19
	Hautmanifestation	19
	Neuroborreliose	20
	Manifestation am Bewegungsapparat	20
2.3.6.	Erkrankung der Tiere mit Lyme Borreliose	21
	Borrelien Infektion bei Hund und Katze	21
	Borrelien Infektion beim Pferd	22
	Borrelien Infektion beim Rind	22
2.4.	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus (FSMEV)	23
2.4.1.	Taxonomie	23
2.4.2.	Morphologie	25
2.4.3.	Genomaufbau	25
	Nichtstrukturproteine	26
	Strukturproteine	27
2.4.4.	Erkrankung des Menschen mit FSMEV	29
2.4.5.	Erkrankung der Tiere mit FSMEV	31
	FSMEV- Infektion beim Hund	31

	FSMEV- Infektion beim Pferd	32
3.	Material und Methoden	33
3.1.	Fangorte	33
3.1.1.	Mäuse	33
3.1.2.	Zecken	34
3.2.	Fangmethodik	35
3.2.1.	Mäuse	35
3.2.2.	Zecken	36
3.3.	Aufarbeitung der Proben	37
3.3.1.	Sektion der Wildmäuse	37
3.3.2.	DNS-Isolierung aus Mäuseohren	37
3.3.3.	RNS-Isolierung aus Hirn und Milz der Mäuse	38
3.3.4.	Aufarbeitung der gefangenen Zecken	38
3.4.	Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion	39
3.4.1.	Übersicht über die Polymerasekettenreaktion	39
3.4.2.	Gelelektrophorese	40
3.4.3.	Sequenzierungen	40
3.4.4.	PCR zum Nachweis von Borrelien-spezifischer Nukleinsäuren	41
3.4.4.1.	Primer	41
3.4.4.2.	Konditionen	42
3.4.4.3.	Kontrollen	43
3.4.5.	RT-PCR zum Nachweis der FSMEV-spezifischen RNS	44
3.4.5.1.	Primer	44
3.4.5.2.	Konditionen	46
3.4.5.3.	Kontrollen	47
3.5.	Interne Kontrollen	48
3.5.1.	Mäuse: Cytochrom b spezifische PCR	48
3.5.1.1.	Primer	48
3.5.1.2.	Konditionen	49
3.5.1.3.	Kontrollen	50
3.5.2.	Zecken: mitochondriale 16S RNS spezifische PCR	50

3.5.2.1.	Primer	50
3.5.2.2.	Konditionen	51
3.5.2.3.	Kontrollen	51
3.6.	Zellkultur und Virusanzucht	52
3.6.1.	Zellkultur	52
3.6.2.	Kryokonservierung von Zellen	52
3.6.3.	Viruspropagierung in Zellkultur	52
3.6.4.	Virustitration	53
3.7.	Datenanalyse	53
3.7.1.	Sequenzanalysen	53
3.7.2.	Phylogenetische Analysen	53
3.7.3.	Datenerfassung und Statistik	54
4.	Ergebnisse	55
4.1.	Fangergebnisse	55
4.1.1.	Zecken	55
4.1.2.	Mäuse	57
4.2.	Ergebnisse der Untersuchungen im Zusammenhang mit FSMEV	59
4.2.1.	Anzucht des Langat-Virus auf PK ₋₁₅ Zellen	59
4.2.2.	Etablierung und Optimierung der nested RT-PCR	59
4.2.3.	Sensitivität und Spezifität der Nachweisverfahren	61
4.2.4.	Ergebnis der PCR Untersuchungen an Zecken auf FSMEV	63
4.2.4.1.	Interne Kontrolle der aus Zecken isolierten RNS	63
4.2.5.	Ergebnis der PCR Untersuchungen an Mäuse auf FSMEV	65
4.2.5.1.	Interne Kontrolle der aus Mäusen isolierten RNS	66
4.3.	Ergebnisse der Untersuchungen im Zusammenhang mit Borrelien	67
4.3.1.	Etablierung und Optimierung der OspA-Gen spezifischen nested PCR	67
4.3.2.	Sensitivität und Spezifität der Nachweisverfahren	67
4.3.3.	Ergebnis der Untersuchung der Mäuse auf Borrelien-	69

	spezifische Nukleinsäure	
4.3.3.1.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit der Art	70
4.3.3.2.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Fangort	70
4.3.3.3.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Geschlecht	71
4.3.3.3.1.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Trächtigkeitszustand	72
4.3.3.3.2.	Borrelien-Infektion bei männlichen Tieren in Abhängigkeit vom Gonadengewicht	72
4.3.3.4.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Gewicht	74
4.3.3.5.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der Kopf- Rumpflänge (KR-Länge)	76
4.3.3.6.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Body mass index (BMI)	78
4.3.3.7.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit des Parasitenbefalls	80
4.3.3.7.1.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit zu Zeckenbefall	80
4.3.3.7.2.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit zu Flohbefall	81
4.3.3.7.3.	Borrelien-Infektion in Abhängigkeit zu Haarlingsbefall	81
4.3.3.8.	Borrelien-Infektion in jahreszeitlicher Abhängigkeit	82
4.4.	Molekulare Analysen	83
4.4.1.	Sequenzanalysen	83
4.4.2.	Stammbaumanalysen	84
5.	Diskussion	88
5.1.	Fangorte und Fangergebnisse	88
5.1.1.	Zecken	88
5.1.2.	Mäuse	88
5.2.	Diskussion der Untersuchungen im Zusammenhang mit FSMEV	90
5.2.1.	E-Protein-Gen spezifische Pan-nested RT-PCR zum Nachweis von FSMEV-spezifischen Nukleinsäuren	90
5.2.2.	Untersuchung der Zecken auf FSMEV	91
5.2.3.	Untersuchung der Mäuse auf FSMEV	92
5.3.	Diskussion der Untersuchungen im Zusammenhang	93

	mit Borrelien	
5.3.1.	OspA-Gen spezifische nested PCR zum Nachweis von <i>Borrelia</i> sp.	93
5.3.2.	Statistische Auswertung über den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Prävalenz	93
5.4.	Molekulare Analysen	96
5.5.	Ausblick	96
6.	Zusammenfassung	97
	Summary	98
	Résumé	99
7.	Literaturverzeichnis	101
8.	Abbildungsverzeichnis	120
9.	Tabellenverzeichnis	123
10.	Anhang	125
10.1.	Materialliste	125
10.1.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	125
10.1.2.	Enzyme, Zellen	126
10.1.3.	Kommerzielle Kits	126
10.1.4.	Chemikalien	126
10.1.5.	Puffer und Lösungen	127
10.2.	Tabellen	129
10.3.	Karten	134
	Danksagung	140

0. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
ASPV	Afrikanisches Schweinepestvirus
Arbo	„ <i>Arthropode-borne</i> “

B

BMI	<i>Body mass index</i>
-----	------------------------

C

°C	Grad Celsius
CDC	Center of Disease Control
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid

D

Dbp	<i>Decorin-binding-protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbeccos Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonuclein acid</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP-Mix	Desoxyribonukleotid Triphosphat-Mischung (enthält wässrige Anteile von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

E

EM	Erythema migrans
et al.	et altera
evtl.	eventuell

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

F

FKS	fetales Kälberserum
FSMEV	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus

G

g	Gramm
---	-------

I

IfSG	Infektionsschutzgesetz
------	------------------------

K

Kb	Kilobasen
Kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
KDa	Kilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KR-Länge	Kopf-Rumpf-Länge
KS-Länge	Kopf-Schwanz-Länge

L

LCB	Lymphadenosis cutis benigna
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherung
Lkr.	Landkreis
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
LUA	Landesuntersuchungsamt

M

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

N

NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NEA	<i>Nonessential Amino Acids</i>
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturproteine
Nr.	Nummer
NTP	Nukleotidtriphosphat

O

Osp	<i>Outer surface protein</i>
-----	------------------------------

P

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia Hydrogenium
p. i.	post infectionem
PK ₁₅	porcine kidney (Verwendete Zelllinie)

R

RAV	reverse Transkriptase
RFLP	Restriktions Fragment-Längen Polymorphismus
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	Ribonukleinsäure

S

Sek.	Sekunde
STMUGV	Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz
STV	Saline-Trypsin-Versene Lösung
s. l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

I

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetat EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBEV	Tick-Borne-Encephalitis-Virus
TCID	<i>Tissue culture infectious dose</i>
Tris	Trishydroxymethylaminoethan

U

UV	Ultraviolett
----	--------------

V

V	Volt
---	------

Z

z.B.	zum Beispiel
------	--------------

1. Einleitung

Bei der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) und der Borreliose handelt es sich um zeckenübertragene Krankheiten. Die FSME ist die bedeutendste durch Gliederfüßler übertragene Viruserkrankung (sogenannte Arbovirose) in Zentraleuropa, die zum Teil bleibende, schwerste neurologische Schäden (z. B. Lähmungen) und eine Letalität von 1-2 % verursacht (Knipe *et al.*, 2001). In Deutschland entfallen ein Drittel der für das Jahr 2003 registrierten Infektionen mit dem FSME-Virus (*Flaviviridae*, RNS-Virus) allein auf Bayern. Die Lyme Borreliose, hervorgerufen durch das Bakterium *B. burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer *et al.*, 1982) ist die häufigste vektor-übertragene Erkrankung in Deutschland. Da es sich bei der Borreliose nicht um eine meldepflichtige Erkrankung handelt, liegen derzeit keine exakten Angaben über Prävalenz und Inzidenz vor (Oehme *et al.*, 2002). Schätzungen zufolge liegt die Inzidenz der Lyme Borreliose in Europa zwischen 16 und 140 je 100.000 Einwohner (O'Connell *et al.*, 1998; Stanek *et al.*, 1993). Dabei belaufen sich die Therapiekosten auf etwa 50 Millionen Euro. Mit der Weiterbehandlung chronischer Verlaufsformen können sich die Kosten bis auf das Doppelte erhöhen (Huppertz *et al.*, 1999). Der Infektionszyklus von FSMEV und *Borrelia burgdorferi* sensu lato ist sehr komplex. Die Erreger werden von Reservoirwirten durch die verschiedenen Zeckenstadien aufgenommen. Diese fungieren als Vektoren und können die Erreger auf Menschen und Tiere übertragen. Über das Vorkommen der Erreger im Reservoirwirt Maus ist bislang nur wenig bekannt. Aber gerade diese Daten sind für die Risikobewertung einer Region basal. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, in ausgewählten Regionen Bayerns Wildmauspopulationen und Zecken auf das Vorkommen von FSMEV und Borrelien hin zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf das aktuelle Gefährdungspotential für Mensch und Tier zu ziehen. Zu diesem Zweck wurden in unterschiedlichen Untersuchungsarealen in Bayern Wildmäuse und Zecken gefangen. Für die Untersuchungen wurden neue, hochsensitive nested PCRs etabliert. In den Wildmäusen wurden Faktoren, die auf das Infektionsgeschehen Einfluß nehmen analysiert. Positive Proben wurden sequenziert und die ermittelten Sequenzen für phylogenetische Analysen verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit bekannten Daten zu Vorkommen der Erreger in Zecken und Mensch verglichen.

2. Schrifttum

2.1. Bedeutung der Lyme Borreliose und der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)

Zeckenübertragene Infektionen haben in der nördlichen Hemisphäre in den letzten 20 Jahren beträchtlich zugenommen. Die Ursachen für diese Entwicklung sind nicht genau bekannt. Diskutiert wird, dass die globale Klimaerwärmung hier eine wesentliche Rolle spielen könnte. In Deutschland gehören neben der Lyme Borreliose und der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME), die Ehrlichiose, das Q-Fieber und die Babesiose zu den wichtigsten durch Zecken übertragenen Infektionen (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, [www. BgVV.de/cd/542](http://www.BgVV.de/cd/542)). Aufgrund der Relevanz für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden auf die Bedeutung der beiden erstgenannten Erreger eingegangen.

Sowohl das Bakterium *Borrelia burgdorferi*, als auch der Erreger der FSME, das Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus (FSMEV) sind auf einen Vektor-Wirtskreislauf angewiesen, der Zecken und verschiedene Säugetierwirte umfasst (Nuttall, 1999). Warme Winter begünstigen die Vermehrung von Kleinnagern, die als Virusreservoir angesehen werden, ebenso wie das gehäufte Auftreten des Vektors Zecke (*Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*), (Kunz, 1999). Parallel dazu hat sich in einer modernen Industrie- und Dienstleistungsgesellschaft das Bedürfnis der Menschen nach einer Freizeitgestaltung, die sich vornehmlich in der freien Natur abspielt verstärkt (Gratz, 1999; Gubler *et al.*, 2001; Rodriguez-Garcia, 2001).

In diesen Zusammenhängen lässt sich die gestiegene Bedeutung der Lyme Borreliose bei Mensch und Tier verstehen (Berglund *et al.*, 1995). Die Lyme Borreliose ist eine Zoonose, hervorgerufen durch *Borrelia burgdorferi*. Das Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* deckt sich größtenteils mit der geographischen Verbreitung von *Ixodes ricinus* Zecken (Abb. 1), dem Hauptvektor des Erregers. Das Verbreitungsgebiet liegt in Europa hauptsächlich zwischen dem 40. Breitengrad als südliche Begrenzung und dem 60. Breitengrad im Norden (Horst, 2003).

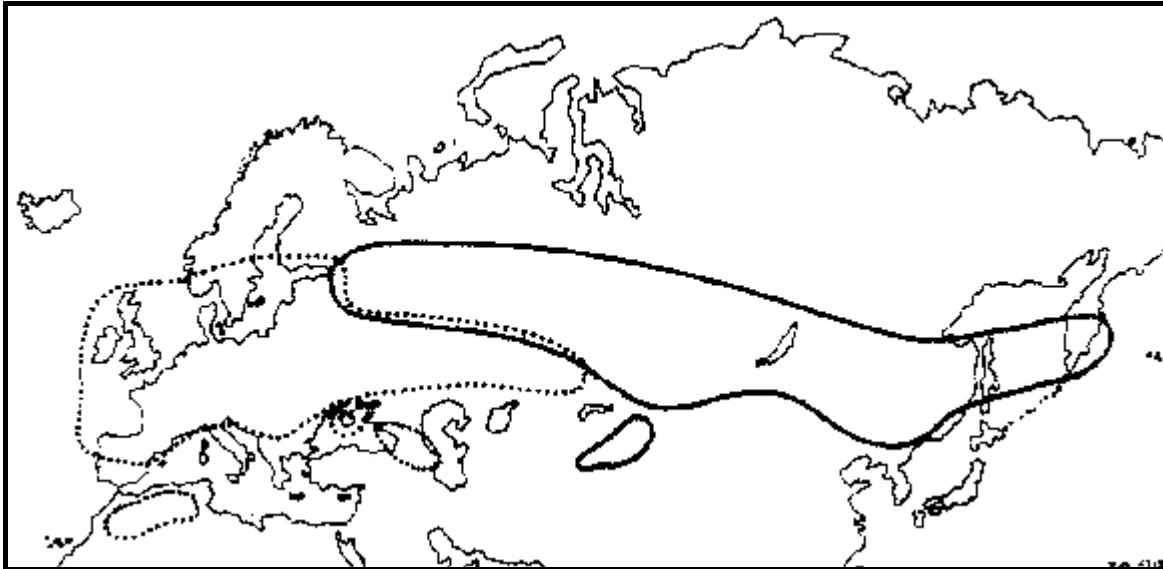


Abb. 1: Verbreitungsgebiete von *Ixodes ricinus* (gestrichelte Linie) und *Ixodes persulcatus* (durchgehende Linie), (modifiziert nach Monath & Heinz, 1996).

Kenntnisse über Vorkommen und Häufigkeit dieser Erkrankung in Deutschland sind lückenhaft. In Deutschland besteht nach dem deutschen Infektionsschutzgesetz keine Meldepflicht für die Borreliose. Angaben zu Prävalenz und Inzidenz basieren daher auf Schätzungen (Oehme *et al.*, 2002). Lediglich einige Bundesländer (Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und der Freistaat Sachsen) machten von der Möglichkeit der Ausweitung der Meldepflicht nach §15 (3) des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) Gebrauch und übermitteln dem RKI (Robert-Koch-Institut) regelmäßig Daten über auftretende Erkrankungen (RKI, Epidemiologisches Bulletin Nr. 28 / 2004). Als Erfassungsgrundlage werden vom RKI Falldefinitionen bereitgestellt (Falldefinition des RKI zu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* / Erythema migrans, frühe Neuroborreliose, Epidemiologisches Bulletin Nr. 28 / 2004). In diesen Bundesländern ist, seit Beginn der Übermittlung von Lyme Borreliose-Erkrankungen an das RKI im Jahr 1991, ein Anstieg der gemeldeten Neuerkrankungen zu verzeichnen. So lag die Zahl der übermittelten Fälle bis 1995 noch unter 300. 1998 stieg die Zahl auf über 1.500 Neuerkrankungen und erreichte im Jahr 2003 mit 3.968 übermittelten Neuerkrankungen den bisherigen Höchstwert (Epidemiologisches Bulletin Nr. 28 / 2004). Die Infektion erfolgt meist von März bis Oktober (bei entsprechenden Witterungsbedingungen eventuell auch früher oder später). Ein Gipfel besteht in den Monaten Juni und Juli. Untersuchungen aus dem Jahr 1999 zeigen, dass in Bayern im Menschen eine Seroprävalenz für Borrelien von 14 % zu finden ist. Wobei sich

80 % der seropositiven Personen nicht an einen vorangegangenen Zeckenstich erinnern konnten (Reimer *et al.*, 1999). Überproportional häufig betroffen sind Personen, die sich berufsbedingt (Forst-, Landwirtschaft) oder aufgrund ihrer Freizeitaktivität vermehrt in Zeckenbiotopen aufhalten (Maiwald *et al.*, 1995).

In den gemäßigten Breiten Europas (Tschechien, Slowakei, Ungarn, Österreich, Slowenien, Schweiz, Polen, Schweden, Deutschland) ist das FSMEV endemisch (Heinz & Mandl, 1993; Monath & Heinz, 1996). Im letzten Jahrzehnt konnte auch in diesen Ländern ein Anstieg an FSME-Erkrankungen festgestellt werden (Kunz, 1999; Randolph *et al.*, 1999; Süss, 2003). Zum Beispiel war in Schweden im Jahr 1994 eine Verdreifachung, im Jahr 2001 eine Verdoppelung der FSME Fälle im Vergleich zum jeweiligen Vorjahr zu beobachten. Dabei wurde eine Korrelation zu dem veränderten, milderen Klima und der damit einhergehenden Zunahme von Zecken nachgewiesen (Lindgren & Gustafson, 2001). Seit 1997 ist die FSME sogar in Norwegen, außerhalb der klassischen Endemiegebiete, zu finden (Ormasen *et al.*, 2001; Skarpaas *et al.*, 2001). Infektionen mit dem FSMEV treten dabei ebenfalls saisonal abhängig von den jahreszeitlichen Temperaturschwankungen in den Monaten März bis November auf (Kaiser, 2000). Insgesamt ist in den letzten Jahren eine Veränderung des saisonalen Infektionsmaximums festzustellen. Infektionen werden etwa drei Wochen früher als in den letzten Jahren verzeichnet (ersichtlich anhand Daten vom RKI und Österreich, Dobler G., pers. Mitteilung). FSME wird als die bedeutendste Arbovirose in Zentraleuropa angesehen (Knipe *et al.*, 2001). Auch hier infizieren sich die meisten Patienten in ihrer Freizeit (Kaiser, 1996). Erkrankungen mit dem meist von *Ixodes ricinus* Zecken übertragenen Europäischen Subtyp des FSMEV verlaufen dabei milder als Infektionen mit dem Fernöstlichen Subtyp der sich eher Zecken der Art *Ixodes persulcatus* als Vektor bedient (Heinz & Mandl, 1993). Die Verbreitung der beiden FSMEV Subtypen ist in Abbildung 2 dargestellt.



Abb. 2: Verbreitungsgebiete von FSMEV; gelb gefärbtes Gebiet: Europäischer Subtyp des FSMEV; rot eingefärbtes Gebiet: Fernöstlicher Subtyp; ocker gefärbtes Gebiet: Überschneidungsgebiet der beiden Subtypen (Quelle: <http://www.punkki.net>).

In Deutschland sind Gebiete in Bayern, in Baden-Württemberg und im Odenwald (Hessen) endemisch für FSMEV. Im Gegensatz zur Lyme Borreliose besteht für die FSME nach §7 Abs. 1 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) eine Meldepflicht. Auch hier stellt das RKI Falldefinitionen als Erfassungsgrundlage bereit (Falldefinitionen für meldepflichtige Infektionskrankheiten, Epidemiologisches Bulletin Nr. 2 / 2002). Im Jahr 1994 wurde eine Verdreizehnfachung (von 11 auf 142 Fälle pro Jahr) der humanen FSME Fälle beobachtet (Kaiser, 1995). 2003 konnten sogar 276 humane FSME-Fälle in Deutschland registriert werden. Für das Jahr 2004 sind bislang 193 Fälle bekannt (RKI, Epidemiologisches Bulletin, Stand 08.10.2004). Auch hier sind Risikogruppen (Forst- und Landwirtschaft) stärker betroffen. So konnte z.B. bei Waldarbeitern in Berlin-Brandenburg eine FSME-Seroprävalenz von 29 % festgestellt werden (RKI Epidemiologisches Bulletin Nr. 16 / 2000). Je nach Anzahl der auftretenden FSME-Erkrankungen werden Stadt-/ Landkreise als Risiko- bzw. Hochrisikogebiete bezeichnet. Allerdings werden für diese Einteilung lediglich humane Erkrankungsfälle berücksichtigt. Als FSME Risikogebiet gelten dabei Kreise, in denen mindestens fünf autochthon entstandene FSME-Erkrankungen in einer fünf

Jahresperiode oder mindestens zwei autochthon entstandene FSME-Erkrankungen innerhalb eines Jahres registriert wurden. Als FSME Hochrisikogebiet gelten diejenigen der als Risikogebiet ausgewählten Kreise, in denen in einer fünf Jahresperiode mindestens 25 FSME-Erkrankungen aufgetreten sind (RKI, Epidemiologisches Bulletin, Nr. 21 / 2003). Deutschlandweit gelten derzeit 83 Stadt- bzw. Landkreise als FSME Risikogebiete, 45 davon entfallen auf Bayern, weitere 30 sind in Baden-Württemberg zu finden. Neun Landkreise werden als Hochrisikogebiete angesehen.

Unklar bleibt, wie viele der Erkrankungen tatsächlich gemeldet werden und ob die veröffentlichten Daten den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. In Anbetracht dessen, dass klinisch geringgradig ausgeprägte Fälle unter Umständen nicht diagnostiziert werden, bleibt die Dunkelziffer ungeklärt. Andererseits könnte ein Anstieg der registrierten Fälle auch durch verbesserte diagnostische Methoden oder eine erhöhte Aufmerksamkeit Grund für den Anstieg der registrierten Fälle sein.

Die zunehmende Relevanz dieser Erreger erfordert genaue Kenntnisse über die Epidemiologie der zeckenübertragenen Infektionskrankheiten. Die Lokalisation der Naturherde bzw. Regionen in denen Infektionen gehäuft auftreten, stellen die Grundlage für infektionsprophylaktische Maßnahmen dar (Kimmig, 2004).

2.2. Erreger-Vektor-Wirt-Interaktion

Sowohl das FSMEV als auch *Borrelia burgdorferi* sind auf einen Vektor-Wirt-Kreislauf angewiesen, der Zecken und verschiedene Säugetierwirte umfasst (Nuttall, 1999). Diese Zoonose-Erreger treten dabei in sogenannten Naturherden, Risiko- und Endemiegebieten auf (Süss, 2003). Das Naturherdkonzept wurde bereits 1939 von E. Pavlovski entwickelt und seitdem von anderen Autoren weiter ausgearbeitet. Es beschreibt das länger andauernde Auftreten eines bestimmten Erregers in einem endemischen, also räumlich begrenzten Gebiet. Dabei ist der Erreger nicht primär im Menschen, der einen Fehlwirt darstellt, angesiedelt (Süss, 2003). Im Laufe der Zeit konnten sich hier wechselseitige Beziehungen zwischen Krankheitserreger, Vektor und Wirt ausbilden (Pavlovski, 1939; Pavlovski, 1966; Kahl, 1994). Durch diese Interaktionen wird der Übertragungsmodus bestimmt (Nuttall, 1999; Süss, 2003). Die Erreger werden dabei von hämatophagen Vektoren auf Wirbeltiere (Reservoirwirte) übertragen. Als Vektor kommen hier vor allem Zecken der Art *Ixodes ricinus* (gemeinhin „Holzbock“ genannt) eine besondere Bedeutung zu, da sie etwa 90 % der gesamten Zeckenfauna West- und Mitteleuropas ausmachen (Eckert, 1998). Im Kontrast zum aktiven Vektor, den saugenden Zecken, werden die Vertebraten, die das Naturreservoir für die Erreger darstellen, als passive Mitglieder in der Vektor-Reservoir-Beziehung beschrieben (Labuda & Randolph, 1999; Spielman *et al.*, 2001).

Interessanterweise ist eine Erregerübertragung auch direkt von einer infizierten auf eine nicht-infizierte Zecke während einer gemeinsamen Blutmahlzeit (sogenanntes co-feeding) möglich, ohne dass dabei eine disseminierte Infektion im Wirt vorliegen muß (Gern & Rais 1996; Randolph *et al.*, 1996; Patrican, 1997; Labuda *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 2003).

2.2.1. *Ixodes ricinus* als Vektor

Zecken sind temporäre Ektoparasiten, die von ihren Wirten Blut und Lymphe aufnehmen. Dies und die Besonderheiten ihrer Entwicklung (siehe unten) prädestiniert sie, als Vektor für Infektionserreger zu fungieren (Süss, 2003). Weltweit sind über 850 verschiedene Zeckenarten bekannt (Keirans, 1992). In West- und Mitteleuropa gibt es rund 20 Schildzeckenarten, die den Gattungen *Ixodes*, *Rhicephalus*, *Dermacentor* und *Haemaphysalis* angehören (Eckert, 1998). Die am häufigsten vorkommende Zeckenart Europas (Eckert, 1998) *Ixodes ricinus* gehört dem Stamm der Arthropoden, der Klasse der Arachnida und der Ordnung der Acari an. Sie sind den Schildzecken zugehörig, die auf ihrem Rücken ein Scutum (einen chitinierten Rückenschild) tragen. Bei männlichen Tieren wird der Rücken vollständig von diesem Schild bedeckt, im Gegensatz zu den weiblichen Tieren und den Entwicklungsstadien, bei denen der herzförmige Schild nur im vorderen Bereich des Rückens liegt (Liebisch & Liebisch, 2003), (Abb. 3A).

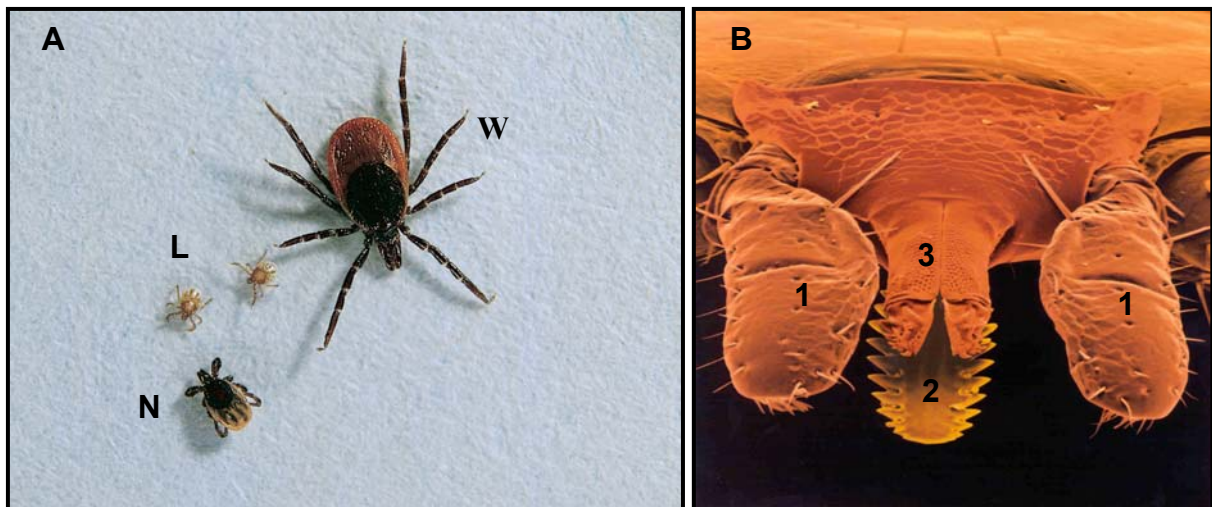


Abb. 3A: Verschiedene Entwicklungsstufen (Larven (L), Nymphen (N) und adultes Weibchen (W) von *Ixodes ricinus*; B: Saugwerkzeug einer Zecke, 1= Pedipalpen, 2= Hypostom, 3= Cheliceren (Quelle: Baxter Deutschland GmbH).

Ixodes ricinus durchläuft eine 3-wirtige Entwicklung. Dabei ist die Zecke in jeder Entwicklungsstufe auf eine Blutmahlzeit angewiesen, um das nächste Entwicklungsstadium zu erreichen. Nach der Blutmahlzeit verlassen die Zecken ihre Wirte, um sich auf dem Erdboden zu häuten (Liebisch & Liebisch, 2003). Der Lebenszyklus der Zecken (Abb. 4) beginnt mit der Eiablage, wobei ein einziges Weibchen bis zu 3000 Eier legen kann (Kutzer, 1992). Bereits die abgelegten Eier können mit FSMEV oder *B. burgdorferi* infiziert sein (Liebisch & Liebisch, 2003). Dies wird als transovarielle oder vertikale Übertragung bezeichnet. Aus den Eiern schlüpfen die ca. 0,5 mm großen, leicht durchsichtig anmutenden Larven. Aufgrund ihres relativ begrenzten Aktionsradius dicht über dem Erdboden, befallen sie vorzugsweise Wirte, die sich in der bodennahen Vegetation aufhalten (z.B. Mäuse). Jedoch werden auch Vögel und größere Säugetiere (einschließlich dem Menschen) befallen. Für die Wirtsfindung orientiert sich die Zecke an mechanischen, thermischen und chemischen Reizen. Ist ein potentieller Wirt ausgemacht, lässt sich die Zecke von der Vegetation abstreifen, klammert sich an ihm fest und sucht nach einer geeigneten Einstichstelle (Liebisch & Liebisch, 2003). Für die Nahrungsaufnahme ritzt die Zecke zunächst die Haut mit den Cheliceren (Abb. 3B) ein und schiebt dann ihren Stechapparat (Hypostom, Abb. 3B) in die Wunde. Neben entzündungs- und gerinnungshemmenden Substanzen wird auch eine Zementsubstanz aus den Speicheldrüsen der Zecke in die Wunde abgesondert, in der sich die Zecke mit den am Hypostom befindlichen Widerhaken verankert (Fingerle, 2001). Nach eingenommener Blutmahlzeit (ca. 3 Tage) lassen sich die Larven zu Boden fallen und entwickeln sich zu Nymphen. Die bis zu 1,5 mm großen Nymphen bevorzugen größere Säuger und Vögel als Wirte (Abb. 4, rechts). Auch der Mensch wird sehr häufig von Nymphen befallen (Liebisch *et al.*, 1995). Nach dieser ca. 5 Tage dauernden Blutmahlzeit schließt die Zecke ihre Entwicklung ab. Die adulten Zecken warten dann, da sie zum Überleben eine Luftfeuchtigkeit von ca. 80 % benötigen, in einer maximalen Höhe von 1,5 m auf ihren nächsten Wirt von dem sie sich abstreifen lassen. Die Begattung erfolgt in der Regel auf dem Wirtstier. Das vollgesogene Weibchen fällt dann zu Boden und stirbt nach der Eiablage. Die Gesamtentwicklungszeit kann bei 3-wirtigen Zecken mehrere Jahre dauern (Kutzer, 1992; Liebisch & Liebisch, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass bis zu 35 % der Zecken mit Borrelien befallen sind, wobei adulte Zecken im Durchschnitt zu 20 %, Nymphen zu 10 % und Larven nur zu

etwa 1 % infiziert sind. Es wird davon ausgegangen, dass bei etwa einem Drittel der Zeckenstiche eine Übertragung der Borrelien auf Mensch oder Tier stattfindet (Maiwald *et al.*, 1998).

Merkmale, die *Ixodes ricinus* in ihrer Rolle als Vektor von anderen sympatrischen Zeckenarten hervorheben, sind also ihr langer Lebenszyklus von 2-6 Jahren sowie die jahreszeitlich überlappende Aktivität von Larven und Nymphen. Dadurch können sowohl viele verschiedene Wirte infiziert werden, ebenso wird eine Infektionsübertragung durch co-feeding (transstadiale oder horizontale Übertragung) erleichtert (Randolph *et al.*, 1999; Liebisch & Liebisch, 2003). In Abbildung 4 ist der Lebenszyklus von *Ixodes ricinus* dargestellt.

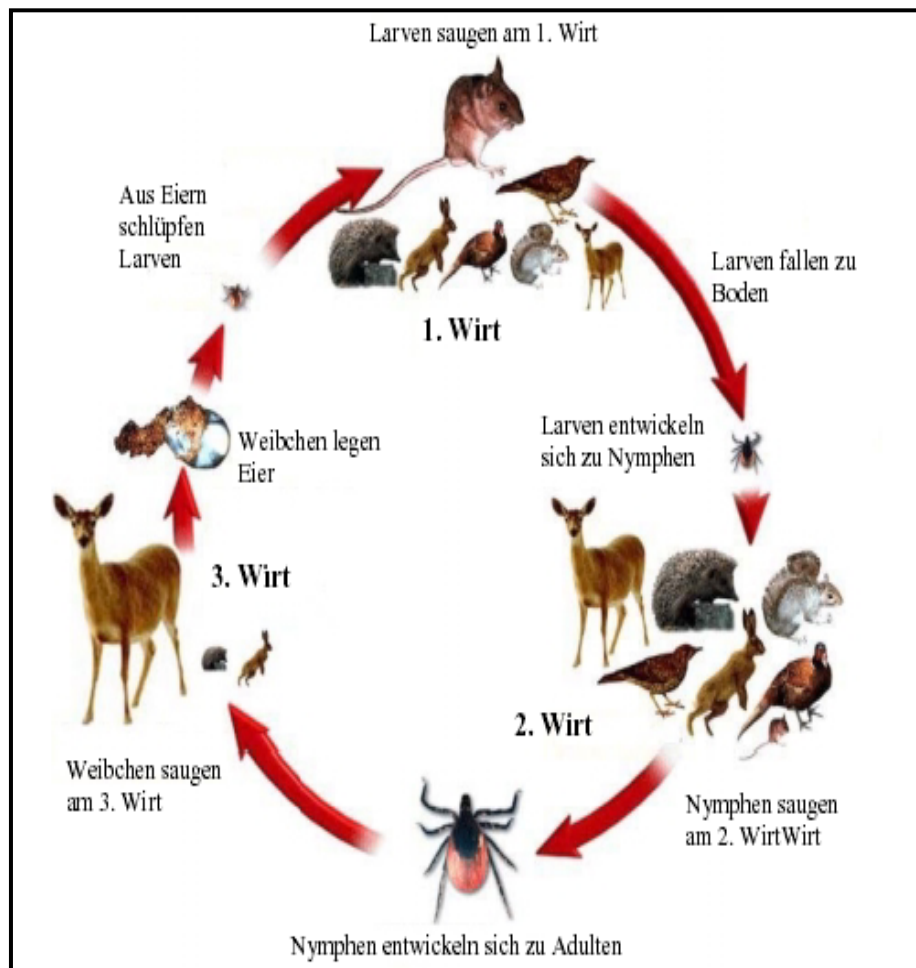


Abb. 4: Lebenszyklus von *Ixodes ricinus*.

(Quelle: www.bibd.uni-giessen.de/gdoc/2000/uni)

2.2.2. Mäuse als Naturreservoir

Weltweit sind Nagetiere mit einem breitgefächerten Spektrum von human- und tierpathogenen Infektionskrankheiten assoziiert. Nager dienen einerseits als Reservoir für die stabile Zirkulation der Erreger und können andererseits als Erregerverschlepper und / oder –überträger von Bedeutung sein (Faulde, 2004). Durch Nischenbesiedlung innerhalb verschiedener Ökosysteme sowie Verhaltens- und Expositionsweise des Menschen, kann das Erregerspektrum der Nagetiere in das direkte Umfeld des Menschen gelangen, was die Infektionswahrscheinlichkeit erhöht (Faulde, 1998).

Die Fähigkeit des Reservoirwirtes Infektionen zu übertragen wird als Reservoir-Kompetenz bezeichnet (Süss, 2003). Dabei ist die Wahrscheinlichkeit der Infektionsübertragung während der Blutmahlzeit vom Reservoirwirt auf den Vektor unterschiedlich hoch. So sind z.B. Nagetierreservoir ca. zwei bis drei Wochen nachdem sie selbst mit Borrelien infiziert wurden, hochinfektiös für die an ihnen parasitierenden Zecken. Der Wirt infiziert dann nahezu alle an ihm saugenden Zecken. Nach dieser Zeit nimmt die Infektiosität ab, jedoch ließ sich eine erfolgreiche Übertragung des Erregers auf die Zecke ungefähr noch weitere 200 Tage nachweisen (Donahue *et al.*, 1987; Shih *et al.*, 1992). Für das FSMEV konnte gezeigt werden, dass Gelbhalsmäuse (siehe Tab. 1) das Virus auf 80 %, Feldmäuse auf 68 %, Rötelmäuse auf etwa 28 % der saugenden Zecken übertragen (Labuda *et al.*, 1997). Experimente mit Wildmäusen dieser drei Genera zeigten auch, dass diese eine Virämie durchmachen und Antikörper bilden (Chunikhin & Kurenko, 1979; Kozuch *et al.*, 1981).

Die Reproduktionsrate eines Erregers wird durch die durchschnittliche Anzahl an sekundären Infektionen, die durch ein infiziertes Individuum in einer empfänglichen Wirtspopulation vermittelt werden, definiert (Anderson & May, 1991). Somit ist ein Reservoirwirt, der eine große Population mit hoher Reproduktionsrate bildet und somit einen schnellen Generationswechsel aufweist, für den Erreger von großem Vorteil (Süss, 2003). Diese Bedingungen werden von Kleinnagern optimal erfüllt. In Tabelle 1 sind für diese Arbeit relevante, als Reservoirwirt mögliche Arten aufgeführt. Dabei sind die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) und die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) die häufigsten in Zentraleuropa auftretenden Mausspezies und sind somit bedeutsame Wirte vor allem für die jugendlichen Stadien von *Ixodes ricinus* (Labuda *et al.*, 1997).

Tab. 1: Taxonomie einiger als Reservoirwirt in Europa bedeutsamer Mausspezies (modifiziert nach Gern *et al.*, 1998).

Familie		Spezies	Lateinische Bezeichnung
Muridae	Echte Mäuse	Brandmaus	<i>Apodemus agrarius</i>
		Waldmaus	<i>Apodemus sylvaticus</i>
		Gelbhalsmaus	<i>Apodemus flavicollis</i>
		Wanderratte	<i>Rattus norvegicus</i>
		Hausratte	<i>Rattus rattus</i>
Arvicolidae	Wühlmäuse	Rötelmaus	<i>Clethrionomys glareolus</i>
		Feldmaus	<i>Microtus arvalis</i>
		Erdmaus	<i>Microtus agrestis</i>

Bislang liegen nur wenige Untersuchungen über die Verbreitung von Borrelien und FSMEV in Wildmäusen vor. In einer Studie konnte eine Korrelation zwischen der geographischen Verteilung der Erreger und Anzahl der Reservoirwirte (vor allem kleine Säuger in Wäldern und Büschen) bzw. Vektoren (insbesondere *Ixodes ricinus*) beobachtet werden (Nuttall & Labuda, 1994). Um das Infektionsrisiko künftig besser abschätzen zu können, ist es notwendig weitere Erkenntnisse über diese Naturherde zu gewinnen.

2.3. Borrelien

2.3.1. Taxonomie

Bei Borrelien handelt es sich um gram negative Bakterien der Ordnung der Spirochaetales und der Familie der *Spirochaetaceae* (Burgdorfer W., 1982). Die Familien der *Leptospiraceae* und der *Brachyspiraceae* sind ebenfalls dieser Ordnung zugehörig. Außer dem Genus *Borrelia* gehören noch fünf weitere Genera zur Familie der *Spirochaetaceae* (Tab. 2), (Paster & Dewhirst, 2000).

Tab. 2: Übersicht über die Familien der Ordnung der Spirochaetales (modifiziert nach Paster & Dewhirst, 2000).

Familie	Genus
<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Borrelia</i>
	<i>Brevinema</i>
	<i>Cristispira</i>
	<i>Spirochaeta</i>
	<i>Spironema</i>
<i>Leptospiraceae</i>	<i>Treponema</i>
	<i>Leptonema</i>
<i>Brachyspiraceae</i>	<i>Leptospira</i>
	<i>Brachyspira (Serpulina)</i>

Das Genus *Borrelia* wird in zwei phylogenetische Hauptgruppen unterteilt. In der einen Gruppe sind die Erreger des Rückfallfiebers (z.B. *B. duttonii*, *B. hispanica*, *B. mazotti*) zusammengefasst. Die andere Gruppe wird als *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplex bezeichnet, der auch die Erreger der Lyme Borreliose beinhaltet (Kurtenbach *et al.*, 1999).

Nach der Entdeckung des Erregers der Lyme disease durch Dr. W. Burgdorfer 1981 in Lyme (Connecticut / USA), nahm man zunächst an, dass es sich hierbei um einen einheitlichen Stamm handeln würde (Burgdorfer *et al.*, 1982). Erst durch genetische Analysen wurde die große Heterogenität dieser Gattung deutlich. So sind bislang zehn Genospezies (siehe Tab. 3) beschrieben (Baranton *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1997; Le Fleche *et al.*, 1997; Kawabata *et al.*, 1993). Des Weiteren werden derzeit sieben OspA- und 70 OspC-Serotypen (davon wahrscheinlich nur 10 invasiv) unterschieden (Baranton *et al.*, 2001; Lagal *et al.*, 2002).

Tab. 3: Genospezies von *Borrelia burgdorferi* s. l. (modifiziert nach Baranton et al., 1992; Wang et al., 1997; Le Fleche et al., 1997; Kawabata et al., 1993; Baranton et al., 2001; Lagal et al., 2002).

Genospezies	Verbreitungsgebiet	Pathogenität
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Nordamerika / Europa	pathogen
<i>B. afzelii</i>	Eurasien	pathogen
<i>B. garinii</i>	Eurasien	pathogen
<i>B. bissettii</i> sp. nov.	Nordamerika / Slowenien	pathogen / Einzelfall
<i>B. valaisiana</i>	Europa	unklar
<i>B. lusitaniae</i>	Europa / Nordafrika	unklar
<i>B. turdi</i>	Eurasien	unklar
<i>B. tanukii</i>	Eurasien	unklar
<i>B. japonica</i>	Eurasien	unklar
<i>B. andersonii</i>	USA	unklar

2.3.2. Morphologie

Borrelien sind schraubenförmige Bakterien mit 4 bis 20 Windungen (Abb. 5A). Sie haben eine Länge von 10-30 µm und eine Breite von nur 0,18-0,25 µm (Salyers & Whitt, 2002). Borrelien bewegen sich wie die übrigen Spirochäten korkenzieherartig (Barbour & Hayes, 1986). Dazu ist eine besondere Zellanatomie nötig (Abb. 5B). Sie besitzen subterminal inserierte Endoflagellen. Diese befinden sich, eng um den Zellkörper gewunden, zwischen der äußeren und inneren Membran des Bakteriums. Durch Kontraktion dieser Fibrillen kann der gesamte Zellkörper in eine rotierende Bewegung versetzt werden. Auch in ihrer Längsachse sind Borrelien biegsam, dadurch können sie auch seitliche Bewegungen ausführen (Horst, 2003). Diese Bewegungsmechanismen ermöglichen Borrelien sowohl ein Eindringen in Gewebe, als auch Fortbewegung in hochviskosen Medien wie der extrazellulären Matrix (Charon & Goldstein, 2002). Sie sind mikroaerophil und catalase-negativ (Russell et al., 1984).

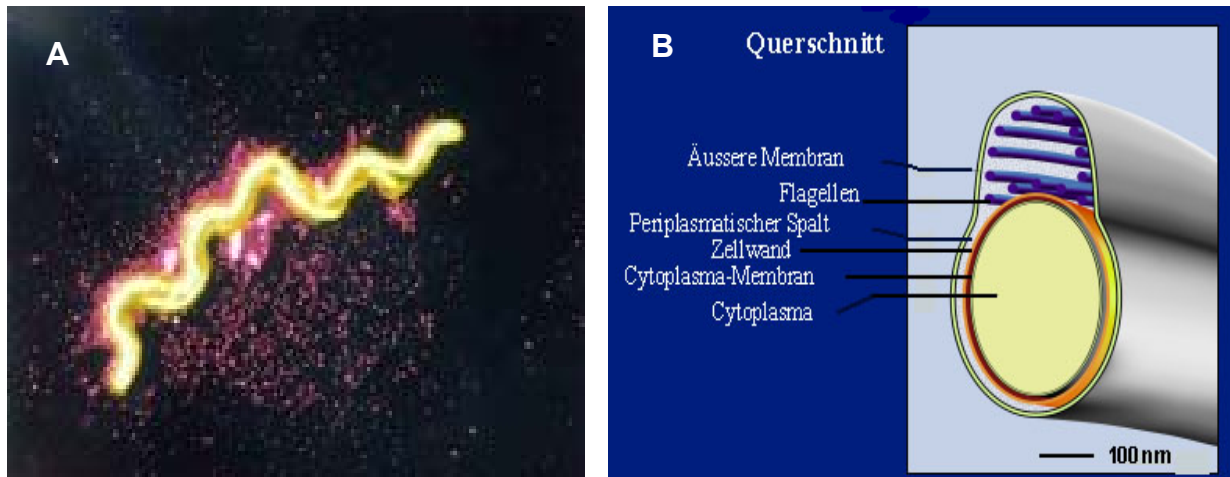


Abb. 5A: Borrelie im Dunkelfeldmikroskop aufgenommen; B: Querschnitt durch eine Borrelie, (Quelle Baxter).

Borrelien besitzen an ihrer äußeren Membran keine Lipopolysaccharide (LPS), jedoch sind in ihre äußere Membran einige Lipoproteine, die sogenannten outer surface Proteine (Osp) eingelagert (siehe unten). Obwohl *Borrelia* Spezies keine LPS aufweisen, wird durch ihre Oberfläche dieselbe Entzündungsreaktion hervorgerufen, wie durch LPS. Man vermutet, dass dies durch die outer surface proteine bedingt ist (Salyers & Whitt, 2002).

2.3.3. Genomaufbau

Die genomische Struktur von *B. burgdorferi* ist, verglichen mit anderen Bakterien, eine der komplexesten unter den Prokaryoten (Porcella & Schwan, 2001). Spirochaeten des Genus *Borrelia* besitzen neben einem linearen Chromosom, mit einer Größe von 910-920 kbp und einem durchschnittlichen Guanin+ Cytosin Gehalt (G+C) von 28,6 %, eine große Anzahl an linearen und zirkulären Plasmiden (Fraser *et al.*, 1997). So konnte für *Borrelia burgdorferi* gezeigt werden, dass es 12 lineare sowie 9 zirkuläre Plasmide mit ca. 610 kpb besitzt. Für kein anderes Bakterium ist eine solch große Anzahl an extrachromosomalen DNS Elementen bekannt (Casjens *et al.*, 2000). Das Chromosom enthält 853 Gene. Diese kodieren für Proteine, die für die DNS-Replikation, -Transkription, -Translation sowie den Stoffwechseltransport und Energiemetabolismus benötigt werden. Gene, die für zelluläre biosynthetische Reaktionen kodieren, sind jedoch kaum vorhanden. So konnten keine Gene ermittelt werden, die für Cytochrome, respiratorische Proteine, oder für Enzyme des Zitronensäurezyklus (ausgenommen Succinat Dehydrogenase) kodieren (Fraser *et*

al., 1997). Diese Erkenntnis deckt sich mit der Beobachtung, dass Borrelien zwar in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen können, ihn aber für ihr Wachstum nicht bedürfen (Salyers & Whitt, 2002). Ein für Lipopolysaccharide kodierendes Gen ist ebenfalls nicht existent. Ein weiterer faszinierender Aspekt an Borrelien ist, dass sie eine neue Strategie entwickelt haben, die es ihnen ermöglicht, eisenunabhängig zu sein. Die wenigen Metalloproteine für die das Genom kodiert benötigen Mangan anstatt Eisen. Dies verschafft ihnen einen besonderen Vorteil, da sie nicht auf die limitierten Eisenvorräte des Wirtsorganismus angewiesen sind (Posey & Gherardini, 2000).

Die Enden der doppelsträngigen DNS der linearen Plasmide bilden covalent geschlossene Haarnadelstrukturen. Diese Plasmide der Borrelien können durchaus mit Replikons anderer Erreger verglichen werden. So konnte durch Sequenzvergleich der Telomere gezeigt werden, dass zwischen *Borrelia* Plasmiden und dem Afrikanischen Schweinepestvirus (ASPV), einem Arbo-Virus aus der Familie der *Asfaviridae*, Ähnlichkeiten bestehen (Hinnebusch & Barbour, 1991; Rolle *et al.*, 2002). Die meisten Plasmide können entfernt werden, ohne dass negative Konsequenzen für die Fortpflanzung der Bakterien in Kultur resultieren. Jedoch bedingt der Verlust von Plasmiden eine verminderte Infektiosität (Xu *et al.*, 1996).

2.3.4. Oberflächenproteine von *Borrelia burgdorferi*

Als *outer surface* Proteine (Osp) werden die Lipoproteine der äußeren Borrelienmembran bezeichnet (Salyers & Whitt, 2002). Eine Vielzahl dieser Lipoprotein-Gene werden nur in einem bestimmten Stadium des Lebenszyklus der Spirochaeten exprimiert (Ohnishi *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Makrophagen, endotheliale Zellen, Neutrophile und B-Zellen durch *B. burgdorferi* *outer surface* Lipoproteine aktiviert werden (Brown *et al.*, 1999).

Das *outer surface* Protein A (OspA) mit einer Größe von 30,5- 33 kDa (Fernández *et al.*, 1997) gehört mit dem OspB (~34 kDa) und dem OspC (21-25 kDa) zu den am Besten untersuchten *outer surface* Proteinen der Borrelien. Die Gene, die für OspA und OspB kodieren bilden gemeinsam ein Operon (Salyers & Whitt, 2002). Sie liegen auf einem 49 kb großen linearen Plasmid (Stanek, 1997). OspA und OspB besitzen auf Aminosäurenebene eine Sequenzhomologie von 53 % und einige Antikörper zeigen Kreuzreaktionen mit beiden Proteinen (Salyers & Whitt, 2002). OspA ruft Immunität gegen Infektionen mit *Borrelia burgdorferi* hervor (de Silva *et al.*, 1997). Im

Darm nüchterner Zecken produziert *Borrelia burgdorferi* vornehmlich OspA (Fingerle *et al.*, 1995). Man vermutet, dass diese selektive Expression von OspA beim Eindringen der Spirochaeten in die Zecke die Anhaftung und Kolonisation des Vektors ermöglicht. Zentral und in seinem terminalen COOH-Bereich besitzt das OspA Domänen, die spezifisch mit einem oder mehreren Proteinen im Zeckendarm Bindungen eingehen. Ebenso werden hier andere OspA gebunden, wodurch die Adhäsion der OspA, speziell bei hoher Borreliendichte, zusätzlich verstärkt wird (Pal *et al.*, 2000). Diese Bindungsmöglichkeit erklärt zumindest teilweise die *in vivo* beschriebene Aggregation von *Borrelia burgdorferi* im Zeckendarm oder die *in vitro* beschriebene Aggregation in Zelllinien (Burgdorfer *et al.*, 1982; Kurtti *et al.*, 1993). Die Rolle des OspA während der Infektion im Säugetier ist noch nicht bekannt (Comstock *et al.*, 1993). Während der Blutmahlzeit der Zecke erfolgt eine Repression der OspA Produktion. Man vermutet, dass dadurch die Freisetzung von *B. burgdorferi* aus dem Zeckendarm sowie die Migration in die Speicheldrüse und letztendlich in den Säugetierwirt erleichtert wird (Pal *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu OspA und OspB liegt das Gen für das outer surface Protein C auf einem 25- 27 kb großen zirkulären Plasmid (Stanek, 1997). Es wird, anders als OspA, während der Blutmahlzeit vermehrt exprimiert und erreicht einen Peak nach 48 Stunden (Ohnishi *et al.*, 2001). Durch OspC wird bereits in einer frühen Phase der Infektion eine streng humorale Immunantwort induziert (Montgomery *et al.*, 1996). Die Repression von OspA sowie die vermehrte Bildung von OspC sind temperaturabhängig (Obonyo *et al.*, 1999). Diese Veränderungen der Proteinzusammensetzung der Oberfläche sind vermutlich entscheidend für die Infektiosität im Säugetierwirt und für das Überleben im Vektor (Schwan, 1996). Das Gen für OspD liegt auf einem 38 kbp großen linearen Plasmid und wird von niedrigen Passagen virulenter *B. burgdorferi* Stämme exprimiert. In Stämmen mit hoher Passagezahl, denen das OspD-kodierende Plasmid fehlte, konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass dies auch mit einem Verlust der Infektionsfähigkeit einhergeht (Norris *et al.*, 1992; Stanek, 1997).

Über die outer surface Proteine E (OspE) und F (OspF), deren Gene als Tandem angeordnet auf einem 45 kb großen Plasmid liegen, ist bislang nur wenig bekannt. Es gilt aber als wahrscheinlich, dass die Erforschung dieser Proteine einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis bezüglich der Pathogenese der Lyme Borreliose und der durch sie induzierten Immunantwort leisten wird (Lam *et al.*, 1994).

B. burgdorferi produziert einige weitere outer surface proteins, die sogenannten ERPS (OspE related proteins) die dem OspE auf Aminosäureebene sehr ähnlich sind. Sie werden in der frühen Phase der Säugetierinfektion gebildet und induzieren eine Antikörperreaktion. Auch *in vitro* kann ihre Bildung durch Erhöhung der Inkubationstemperatur von 23°C auf 35°C ausgelöst werden, was ein Hinweis auf ihre Rolle bei der Wirtstieradaptation sein könnte (Salyers & Whitt, 2002). Eine weitere sehr interessante Gruppe von Oberflächenproteinen sind die Dbps (Decorin-binding-proteins). Es handelt sich dabei um die sehr ähnlichen Dbp A (20 kDa) und Dbp B (18 kDa), (Guo *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1998). Die beiden Proteine werden von Genen eines linearen Plasmides kodiert und werden von *Borrelia burgdorferi* in Säugetiergewebe exprimiert (Parveen *et al.*, 2003). Sie vermitteln die Bindung von *B. burgdorferi* an Decorin, ein Proteoglykan das Kollagenfibrillen bedeckt, im Säugetierwirt (Salyers & Whitt, 2002; Guo *et al.*, 1995). Trotz der Annahme, dass Dbps eine wichtige Rolle bei der Besiedlung des Wirtstiergewebes spielen, ist bislang ihre genaue Funktion, insbesondere das Zusammenspiel mit anderen Faktoren, nicht ausreichend charakterisiert (Fischer *et al.*, 2003). Des Weiteren besitzt *B. burgdorferi* ein variables Oberflächenprotein, das 34 kDa große VlsE (variable-major-protein (Vmp)-like sequence (vls) E), (Liang & Philipp, 1999). Das für VlsE kodierende Gen liegt auf einem linearen Plasmid. Im Laufe einer Infektion finden hier Rekombinationen statt, aus denen sich für VlsE eine große antigenetische Varianz ergibt (Zhang *et al.*, 1997; Indest *et al.*, 2001). Diese Varianz ermöglicht es dem Erreger, zumindest vorübergehend der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (Liang & Philipp, 1999).

2.3.5. Erkrankung des Menschen mit Lyme Borreliose

Die Lyme Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, die sich überwiegend als lokalisierte Hautinfektion manifestiert (Erythema migrans, EM), (Steere, 1989). Die Klinik der Lyme Borreliose wird in frühe und späte Manifestationen eingeteilt (Shapiro & Gerber, 2000; Steere, 2001). Von der ehemals vorgenommenen Einteilung der Lyme Borreliose in drei Stadien (z.B. Steere *et al.*, 1986) ist man abgekommen, da ein hierdurch suggeriertes konsekutives Durchlaufen verschiedener Organmanifestationen nur ausnahmsweise auftritt. Frühe Manifestationen treten Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich auf. Späte Manifestationen hingegen treten erst nach Monaten bis zu zwei Jahren in Erscheinung, können nach einem rezidivierenden Verlauf chronisch werden und dann zu bleibenden Organschäden führen (Huppertz & Krause, 2003). Diese Einteilung verschafft zwar einen Überblick über den komplexen Krankheitsverlauf der Lyme Borreliose, grundsätzlich kann jedoch jede der im Folgenden genannten klinischen Manifestationen in jeder Phase der Erkrankung isoliert oder aber auch in unterschiedlichen Kombinationen auftreten (Horst, 2003).

Hautmanifestation

Das pathognomische Krankheitsbild der Frühmanifestation ist das Erythema migrans (EM), (Shapiro & Gerber, 2000). Es tritt Tage bis Wochen nach einem Zeckenstich (üblicherweise nach ca. 7-10 Tagen) um die Stichstelle in Erscheinung. Dabei findet sich ein zumeist nicht juckendes, sich zentrifugal ausbreitendes Erythem, das bei längerem Bestehen eine zentrale Abblassung zeigen kann. Das Erythema migrans kann in seiner Ausprägung stark variieren, atypische Verläufe mit Papeln und Quaddeln sind möglich (Shapiro & Gerber, 2000; Huppertz & Krause, 2003). Seltener tritt als erste Hautmanifestation die Lymphadenosis cutis benigna (Borrelienlymphozytom, LCB) auf, die sich als livide Schwellung an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum darstellt. Ebenso treten in dieser frühen Phase der Infektion gelegentlich unspezifische Allgemeinsymptome, wie z.B. Fieber, Myalgie, Arthralgie, Kopfschmerz, Konjunktivitis oder Lymphknotenschwellung in Erscheinung. Die Diagnose wird dadurch erschwert, dass diese unspezifischen Symptome auch ohne EM auftreten können, das nur bei etwa der Hälfte der Patienten manifest wird (Horst, 2003; Huppertz & Krause, 2003).

Durch hämatogene Aussaat kann es bei der frühen disseminierten Form der Lyme Borreliose in der Regel nach 3-5 Wochen zur Ausbildung multipler Erythema migrans kommen (Shapiro & Gerber, 2000). Eine mögliche Hautmanifestation in der Spätphase ist die Acrodermatitis chronica atrophicans, einhergehend mit Hautatrophie nach entzündlichen Veränderungen an den Extremitäten (Huppertz & Krause, 2003). Die Acrodermatitis chronica atrophicans wird nahezu ausschließlich in Europa angetroffen (Wilske, 2001).

Neuroborreliose

Bei Kindern kann in der Frühphase der Infektion eine lymphozytäre Meningitis, mit oder ohne Hirnnervenlähmung (v.a. N. facialis) auftreten. Bei Erwachsenen hingegen steht meist die sehr schmerzhaft Polyradikuloneuritis (Bannwarth-Syndrom) im Vordergrund, charakterisiert durch quälende, brennende Schmerzen, die vor allem nachts exazerbieren und ebenfalls häufig mit Hirnnervenparese assoziiert sind. Die meningitische Symptomatik ist hier meist weniger stark ausgeprägt (Wilske, 2001; Huppertz & Krause, 2003). Sehr selten kann es in der Spätphase zur zerebralen Vaskulitis oder chronisch progredienten Enzephalomyelitis mit Para- und Tetra-Paresen kommen (Wilke *et al.*, 2000; Wilske, 2001). Symptomatisch ist hier zuweilen die Abgrenzung zur multiplen Sklerose problematisch, man bedient sich daher dem Nachweis erregerspezifischer Antikörper aus dem Liquorraum (Wilske, 2001; Horst, 2003).

Manifestation am Bewegungsapparat

Im Vordergrund der Spätphase der Erkrankung steht die Lyme-Arthritis, die typischerweise monoartikulär bzw. oligoartikulär ist und oftmals intermittierend verläuft (Shapiro & Gerber, 2000; Huppertz & Krause, 2003). In der Mehrzahl der Fälle ist hierbei das Kniegelenk betroffen (Huppertz *et al.*, 1995). Eine Polyarthrit tritt selten auf (Huppertz & Krause, 2003). In nur etwa 10 % der Fälle kommt es zu einem chronischen Befall der Gelenke (Wilske, 2001).

In Tabelle 4 sind die klinischen Manifestationen der Lyme Borreliose zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4: Klinische Manifestationen der Lyme Borreliose beim Menschen (modifiziert nach Huppertz & Krause, 2003).

Organ	frühe Manifestation	späte Manifestation
Haut	Erythema migrans, LCB	Acrodermatitis chronica atrophicans
Nervensystem	Lymphozytäre Meningitis +/- Hirnnervenlähmung, Polyradikuloneuritis	Chronische Enzephalomyelitis, zerebrale Vaskulitis
Bewegungsapparat	Arthralgie	Arthritis, Myositis
Andere	Karditis, „Sommergrippe“	Uveitis, Keratitis

2.3.6. Erkrankung der Tiere mit Lyme Borreliose

Da Haustiere in der Regel häufiger und in stärkerem Ausmaß als der Mensch vom Befall mit Zecken betroffen sind, ist das Risiko eine durch Zecken übertragene Krankheit zu erwerben naturgemäß gegeben (Liebisch & Liebisch, 2003). Allerdings ist noch weitgehend unbekannt, inwieweit und wann infizierte Tiere an einer Borrelien-Infektion erkranken oder aufgrund der Persistenz des Erregers zu einem Reservoir für Borrelien werden, ohne dabei klinisch auffällig zu werden (Liebisch, 1997).

Borrelien-Infektion bei Hund und Katze

Der sichere experimentelle Nachweis zur Reproduzierbarkeit der Lyme Borreliose in Hunden, unter Erfüllung der Koch'schen Postulate wurde im Jahr 1992 von Wasmoen erbracht (Wasmoen *et al.*, 1992). Die Ausbildung eines Erythema migrans wird bei Hunden nur ausnahmsweise beschrieben. Dies ist sicherlich auch auf die oftmals dunkel pigmentierte Haut bei Hunden zurückzuführen, da ein Erythema migrans hier häufig unerkant bleibt (Liebisch & Liebisch, 2003). Beim Hund wird neben unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie Anorexie, Mattigkeit und Fieber, vor allem intermittierende Lahmheit, bedingt durch Arthritiden und Gelenkergüsse, als dominierendes Symptom beschrieben (Appel *et al.*, 1993; Breitschwerdt *et al.*, 1994; Liebisch & Liebisch, 2003). Ebenso konnte zuweilen von Lymphadenopathie, chronischen Nephritiden mit Urämie, Affektionen von Herz und Nervensystem sowie

rheumatoider Arthritis infolge von Infektion mit *Borrelia burgdorferi* berichtet werden (Roush *et al.*, 1989; Fischer & Leuterer, 1992; Kraft, 2000).

In serologischen und experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch Katzen für eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* empfänglich sind, jedoch nach einer Infektion nicht zwangsläufig klinische Symptome zeigen (Magnarelli *et al.*, 1990; Burgess, 1992). Dies mag ein Grund sein, weshalb bislang in der Literatur nur spärliche Angaben zum Krankheitsbild der Lyme Borreliose bei Katzen zu finden sind. Berichtet wurde über Lahmheit und Gelenksbeschwerden, ohne zusätzlich Allgemeinsymptome wie Fieber, Anorexie oder Ermüdungserscheinungen oder über Katzen bei denen lediglich die genannten Allgemeinsymptome ohne Lahmheit bestanden (Magnarelli *et al.*, 1990; Kraft, 1996).

Borrelien-Infektion beim Pferd

Wie eine Untersuchung aufwies, wurden die meisten Pferde aufgrund wenig spezifischer Symptome wie Abmagerung, Leistungsabfall, Gelenkentzündung, steifer Gang und Lahmheit vorgestellt. Mehrfach konnten Polyarthritiden beobachtet werden. Ebenfalls auffällig war der hohe Anteil an Augenerkrankungen, wie Konjunktivitis, Keratokonjunktivitis und Retinitis (Parker & White, 1992; Liebisch, 1997; Liebisch & Liebisch, 2003). Aus Wisconsin wurde von einem Fall berichtet, bei dem eine *Borrelia burgdorferi*-Infektion mit Enzephalitis assoziiert war. Das Pferd zeigte zentralnervöse Störungen. Differentialdiagnostisch in Frage kommende Erkrankungen wie Eastern und Western Equine Enzephalomyelitis (Fam. *Togaviridae*) und Tollwut (Fam. *Rhabdoviridae*) konnten in diesem Fall ausgeschlossen werden (Burgess & Mattison, 1987).

Borrelien-Infektion beim Rind

Die erste detaillierte Fallbeschreibung eines mit *Borrelia burgdorferi* infizierten Rindes erfolgte 1987 aus einem nicht endemischen Gebiet aus Wisconsin. Es wurde über hochgradige akute Lahmheit, Myokarditis, Gewichtsverlust und Glomerulonephritis berichtet (Burgess, *et al.*, 1987). In einer weiteren, umfangreichen Studie wurden als die am häufigsten auftretenden Symptome Lahmheit, Gelenkschwellung, Steifheit, Gewichtsverlust sowie Fieber und Abort beschrieben (Burgess, 1988).

2.4. Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus (FSMEV)

2.4.1. Taxonomie

Das Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus (FSMEV) ist ein Arbovirus (*Arthropode borne virus*) und gehört zur Familie der *Flaviviridae*. Diese Familie umfasst drei Genera (Tabelle 5).

Tabelle 5: Charakteristische Vertreter der Flaviviren (Modrow *et al.*, 2003).

Genus	Mensch	Tier
<i>Flavivirus</i>	FSME-Virus	FSME-Virus
	Gelbfiebervirus	Gelbfiebervirus
	Denguevirus Typ 1-4	Wesselbronnvirus
	West-Nile-Virus	West-Nile-Virus
	Japanese-Enzephalitis-Virus	Louping-III-Virus
	St.-Louis-Enzephalitis-Virus	
<i>Pestivirus</i>		Classic-Swine-Fever-Virus (klassische Schweinepest)
		Virus der bovinen Virusdiarrhö (Mucosal Disease)
		Border-Disease-Virus
<i>Hepacivirus</i>	Hepatitis-C-Virus	
unbenannt	Hepatitis-G-Virus	

Das Genus *Flavivirus* wird anhand von Kreuzreaktionstests mit polyklonalen Hyperimmunsereen in unterschiedliche Serogruppen unterteilt (Calisher *et al.*, 1989). Die drei Subtypen des FSME-Virus (Europäischer-, Fernöstlicher- und Sibirischer Subtyp) werden, wie das ebenfalls für diese Arbeit verwendete Langat-Virus der Serogruppe der Tick-borne-encephalitis-Viren (TBE-Viren) zugeordnet. Die Unterteilung des FSMEV in einen Europäischen und einen Fernöstlichen Subtyp erfolgte bereits in den sechziger Jahren (Clarke, 1964), wohingegen der Sibirische Subtyp des FSMEV erst vor wenigen Jahren beschrieben wurde (Ecker *et al.*, 1999; Heinz *et al.*, 2000). Alle Viren dieser Gruppe werden von Zecken übertragen (Mandl *et al.*, 1989). Eine Übersicht über Flaviviren dieser Serogruppe gibt Abbildung 6.

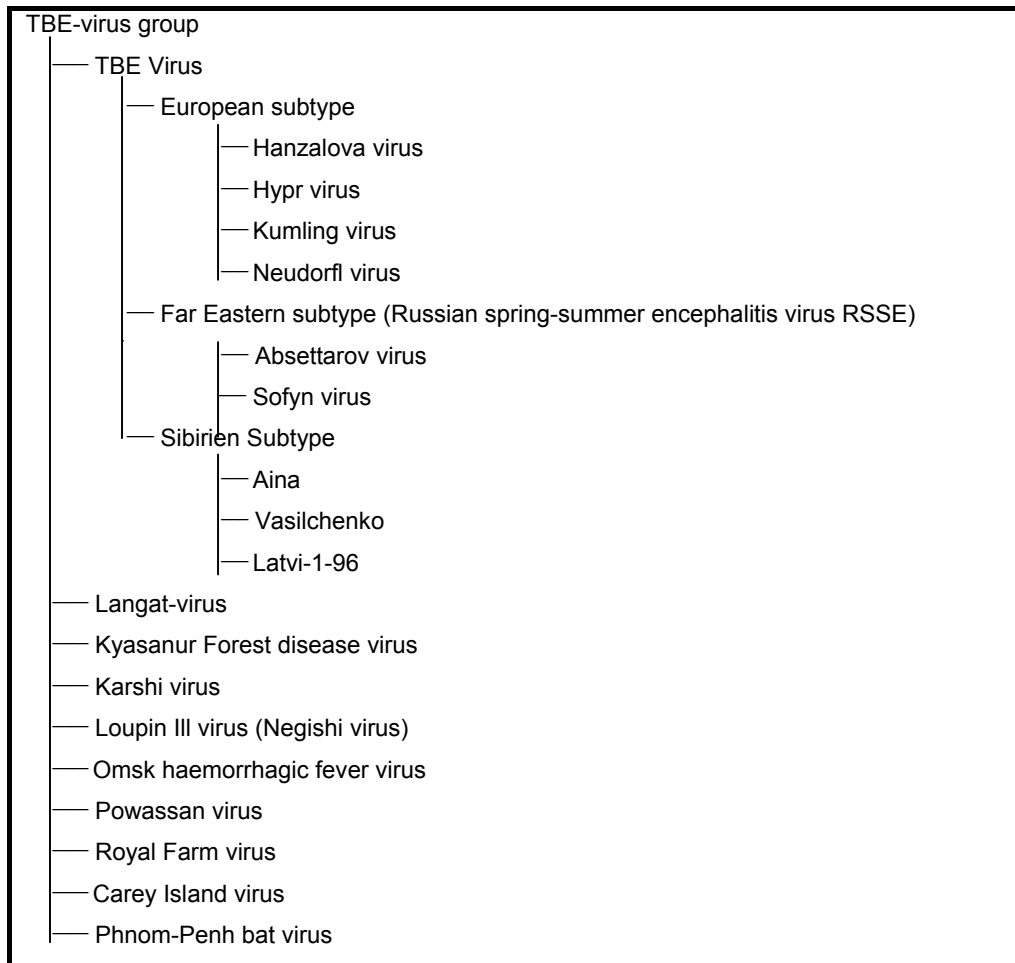


Abb. 6: Übersicht über die Serogruppe der TBE-Viren, erstellt anhand von Sequenzanalysen (modifiziert nach Grěsiková & Kaluzová, 1997).

Die enge verwandtschaftliche Beziehung der Erreger einer Serogruppe wird deutlich durch den Sequenzvergleich von Strukturproteinen. So konnte z.B. durch Vergleich der Aminosäuresequenzen des E-Proteins eine Sequenzhomologie für die Viren einer Serogruppe zwischen 62-83 %, für die Subtypen des FSMEV sogar eine Homologie von 94-97 % nachgewiesen werden, wohingegen die Sequenzhomologie zwischen Viren unterschiedlicher Serogruppen bei nur 41-53 % liegt (Mandl *et al.*, 1988; Heinz, 1999).

2.4.2. Morphologie

Das Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus ist ein behülltes, ca. 40-50 nm großes RNS Virus mit einem ikosaedralen Kapsid (Abb. 8A). Das Kapsid besteht aus der positiven RNS und dem C-Protein (**C**apsid-Protein). Neben dem Kapsidprotein besitzt das FSMEV lediglich zwei weitere Strukturproteine, das M-Protein (**M**embran-assoziiertes Protein) und das E-Protein (**E**nvelope-Protein), die beide in die Lipidhülle eingelagert sind (Heinz, 1999). Des weiteren weist es sieben Nichtstrukturproteine auf, die für die Replikation des Virus in der Zelle notwendig sind (Chambers *et al.*, 1990).

2.4.3. Genomaufbau

Das Genom des FSMEV liegt als einzelsträngige 10477 Basen lange RNS mit positiver Polarität und einem durchgehenden offenen Leserahmen vor. Die genomische RNS ist polaritätsbedingt direkt infektiös und fungiert als einzige virus-spezifische mRNA in der infizierten Wirtszelle. An ihrem 5' Ende weist sie eine Cap-Struktur auf (Heinz & Mandl, 1993). Der Leserahmen wird am 5'- und 3'- Ende von nichttranslatierten Nukleotidfolgen flankiert, die für die RNS-Replikation bedeutsam sind (Chambers *et al.*, 1990). In Abbildung 7 ist die Genomorganisation des FSMEV dargestellt.

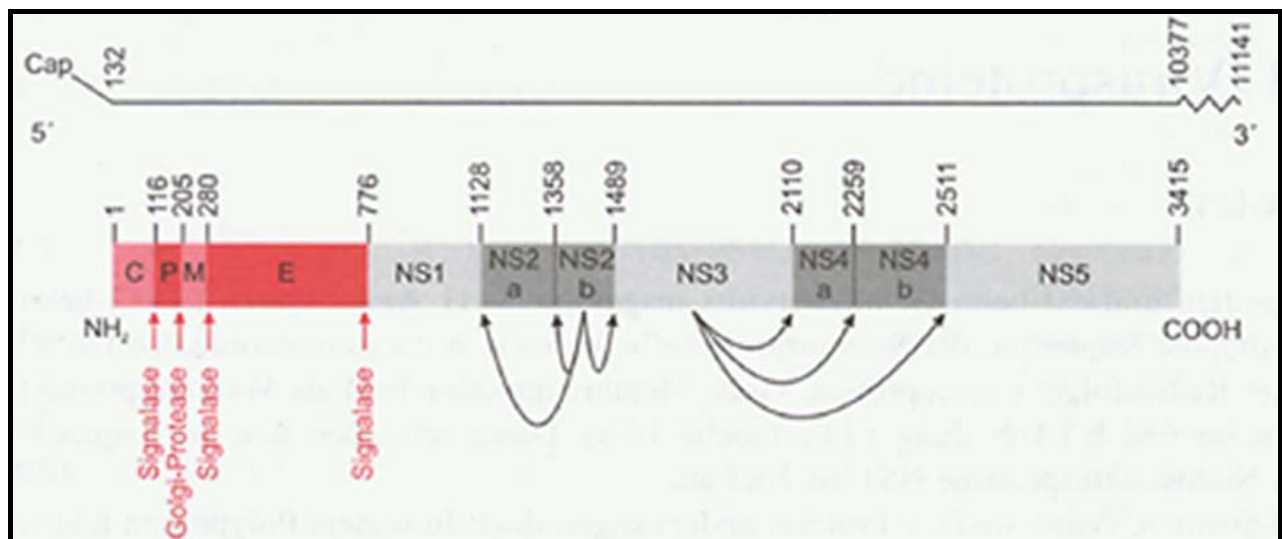


Abb. 7: Genomaufbau des FSMEV (modifiziert nach Modrow *et al.*, 2003).

Nichtstrukturproteine

NS1, NS2A, NS2B, NS3 NS4A, NS4B und NS5 sind die Nichtstrukturproteine des FSMEV. Bei den Nichtstrukturproteinen NS1, NS3 und NS5 handelt es sich um hochkonservierte Bereiche (Chambers *et al.*, 1990). Die Hauptfunktion der Nichtstrukturproteine (NS) besteht in der Replikation der viralen RNS (Lindenbach & Rice, 1999). Das NS1-Protein ist mit der Zellmembran assoziiert und wird teilweise durch Sekretion von der Zelle abgegeben (Modrow *et al.*, 2003). Bei einigen Flaviviren scheint es die antikörpervermittelte Lyse der infizierten Zelle einzuleiten und besitzt somit die Fähigkeit eine protektive Immunität hervorzurufen (Muylaert, 1997). Die genaue Funktion des 39 bis 41 kDa großen Proteins während des Infektionszyklus ist umstritten, jedoch gibt es Hinweise, dass es am intrazellulären Transport der viralen Strukturproteine und an der Virusfreisetzung beteiligt ist. Das 14 kD große NS2B-Protein wird als ein essentieller Cofaktor der NS3-Protease angesehen, die als Heterodimer bestehend, aus NS2B und NS3 vorliegen. Für das NS3-Protein (70 kDa) konnte gezeigt werden, dass es in der späten Phase der Infektion an der RNS Replikation beteiligt ist (Morozova *et al.*, 1991). Es verfügt über Proteaseaktivität in seinem aminoterminalen Bereich ebenso wie über NTP-Bindungsstellen und Helicaseaktivität in der carboxyterminalen Region (Takegami *et al.*, 1994; Modrow *et al.*, 2003). Das NS5-Protein, mit 100 kDa das größte Nichtstrukturprotein des FSMEV, ist die RNS-abhängige RNS-Polymerase und somit essentiell für die RNS Replikation. Die putative Methyltransferase im aminoterminalen Bereich des Proteins ist vermutlich in den Capping-Prozess eingebunden (Chambers *et al.*, 1990). Die Bedeutung der kleinen, hydrophoben NS2A, NS4A und NS4B sind bislang nicht bekannt (Modrow *et al.*, 2003).

Strukturproteine

Kapsidprotein: Das 13-16 kDa große Kapsidprotein ist reich an basischen Aminosäuren. Sein stark hydrophobes carboxyterminales Ende wirkt als Signalpeptid für das prM-Protein. Somit ist es für die Inkorporation des in Translation befindlichen Polyproteins in die Membran des endoplasmatischen Retikulums verantwortlich und induziert die Spaltung durch zelluläre Signalpeptidase (Modrow *et al.*, 2003).

M-Protein: Das M-Protein mit einer Größe von 7-8 kDa ist nur in reifen, infektiösen Viruspartikeln anzutreffen. Unreife, nichtinfektiöse Viruspartikel, die außerstande sind in Zellen einzudringen (Guirakhoo *et al.*, 1991), enthalten eine Vorstufe dieses Proteins, nämlich das 24-27 kDa große prM-Protein (**precursor of M**). Das noch ungespaltene prM-Protein geht in unreifen Virionen einen protektiven Komplex mit dem Envelope-Protein ein (siehe unten). Im Laufe der Virusreifung wird im Golgi-Apparat der aminoterminaler Anteil des prM-Proteins durch die zelluläre Protease Furin abgespalten. Die Spaltung des prM-Proteins wird von einer Konformationsänderung des E-Proteins begleitet (Wengler & Wengler, 1989). Durch Endozytose werden die reifen, das M-Protein enthaltenden Viruspartikel entlassen (Heinz, 1999).

E-Protein: Mit einer Größe von 50–60 kDa stellt das Envelope-Protein die Hauptkomponente der Virusoberfläche dar (Heinz *et al.*, 1991). Bei einigen wichtigen Virusfunktionen ist es von zentraler Bedeutung. So induziert es die Bildung virusneutralisierender Antikörper, die vor einer Neuinfektion mit dem selben Virustyp schützen und ist zudem verantwortlich für die hämagglutinierenden Eigenschaften der Flaviviren (Modrow *et al.*, 2003). Ebenso spielt es eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorerkennung und Fusion der Viren mit der Endosomenmembran (Heinz & Roehrig, 1990). Die meisten der bislang untersuchten viralen Fusionsproteine können zwei unterschiedlichen Klassen zugeordnet werden (Lescar *et al.*, 2001). Fusionsproteine der Klasse I, die beispielsweise in Orthomyxoviren oder Retroviren vertreten sind, bilden an der Virusoberfläche sogenannte „Spikes“ aus. Diese werden zunächst in einer Vorläuferform gebildet und bedürfen einer proteolytischen Spaltung, um aktiviert zu werden. Im Gegensatz dazu stehen die Fusionsproteine der Klasse II, zu der auch das E-Protein des FSMEV gehört. Hier sind die Proteine parallel zur Virusmembran angeordnet (Stiasny *et al.*, 2003). Mittels Röntgenbeugung gelang es 1995 erstmals den außergewöhnlichen Aufbau des E-Proteins von FSMEV darzustellen (Rey *et al.*, 1995). Es liegt als Dimer der

Virusoberfläche flach auf. In Abbildung 8B ist die Struktur des E-Proteins in einem Bändermodell dargestellt. Für die Aktivierung der Fusionsproteine der Klasse II ist eine proteolytische Spaltung nicht erforderlich, jedoch sind sie mit einem zweiten Protein assoziiert (bei FSMEV handelt es sich um das oben beschriebene prM-Protein), dessen Spaltung für die Fusion essentiell ist (Heinz & Allison 2000; Heinz & Allison 2001). Während des intrazellulären Transportes durch die sauren Kompartimente des Trans-Golgi-Netzwerkes ist die Komplexbildung zwischen E-Protein und prM-Protein jedoch von besonderer Bedeutung, da es eine vorzeitige Konformationsänderung des E-Proteins in diesem sauren Milieu verhindert (Allison *et al.*, 1995). Erst die Spaltung des prM-Proteins ermöglicht die für den Fusionsprozess so wichtige Umwandlung des im reifen FSMEV als Dimer vorliegenden E-Proteins in ein stabileres Trimer. Diese in zwei Stufen erfolgende Dimer-Trimer-Transition wird durch eine pH-Wert Absenkung ausgelöst, wobei als Schwellenwert pH 6,5 angesehen wird (Allison *et al.*, 1995). Abbildung 8A zeigt die Anordnung der Proteine im unreifen und reifen Virion.

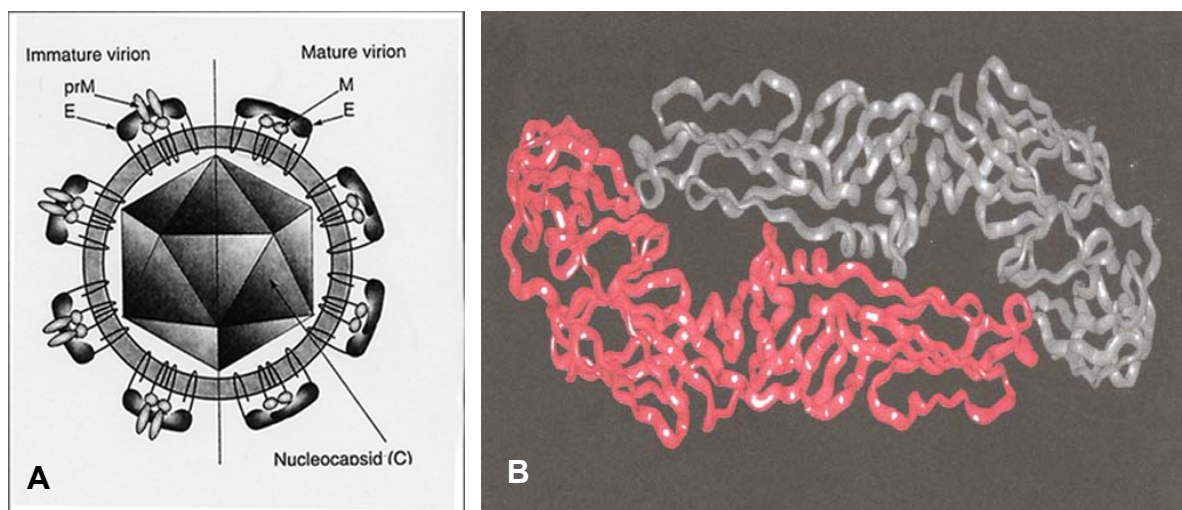


Abb. 8A: Schematische Morphologie eines unreifen und reifen Virus (modifiziert nach Heinz, 2003); B: Bändermodell des E-Proteins (aus Modrow *et al.*, 2003).

2.4.4. Erkrankung des Menschen mit FSMEV

In der Literatur sind zwei mögliche Infektionswege, über die FSMEV in den Körper gelangen kann, beschrieben. Entweder vektorvermittelt durch den Stich einer infizierten Zecke, oder über Rohmilchkonsum (Dumpis *et al.*, 1999). Die Infektion durch Verzehr von Rohmilch spielt jedoch eine deutlich untergeordnete Rolle (Rieger *et al.*, 1998).

Die Mehrzahl der FSMEV-Infektionen verläuft klinisch inapparent, nur etwa 30 % der Infizierten erkranken (Heinz & Holzmann, 2001; Modrow *et al.*, 2003). Bei zwei Drittel der Patienten verläuft die Erkrankung biphasisch (Gerold, 2001). Nach einer Inkubationszeit von 7- 14 Tagen tritt ein febriler, unspezifischer Symptomenkomplex mit Kopfschmerz, Unwohlsein, Myalgie etc. auf, der kaum von einem grippalen Infekt zu unterscheiden ist und nach einigen Tagen wieder abklingt. Nach einem beschwerdefreien Intervall von etwa einer Woche manifestiert sich bei etwa einem Drittel der Patienten die zweite Phase der Erkrankung, die mit einem erneuten Fieberschub beginnt. Entsprechend der Schwere der Erkrankung, kann es zur Ausbildung einer aseptischen Meningitis bis hin zu Meningo-Enzephalitis kommen. Die schlimmste Form der Erkrankung ist die Menigo-Enzephalomyelitis, die mit starken Schmerzen in Rücken und Extremitäten einhergehen kann. Die Beteiligung der Hirnnerven und des Motoneurons im Vorderhorn des Rückenmarks führt zur Ausbildung einer schlaffen Lähmung von Hals und oberen Extremitäten (Noack, 1997; Dumpis *et al.*, 1999; Heinz & Holzmann, 2001; Horst, 2003; Modrow *et al.*, 2003). Bei Patienten mit zerebralen Symptomen persistieren in 2- 10 % neurologische Ausfälle und in 0,5- 2 % ist ein letaler Ausgang zu erwarten (Holmgren & Forsgren, 1990; Gustafson, 1994; Schwanda *et al.*, 2000). Im Vergleich zu Infektionen mit dem osteuropäischen Virustyp, die im Allgemeinen schwerwiegend mit hoher Letalität verlaufen, sind die Infektion mit dem europäischen Virustyp in der Regel relativ mild (Horst, 2003; Modrow *et al.*, 2003). Klinische Fallbeispiele über ungewöhnlich fulminant verlaufende europäische FSME-Infektionen mit tödlichem Ausgang sind jedoch ebenfalls bekannt (Herzig *et al.*, 2002). Bei Kindern scheint der Krankheitsverlauf milder zu sein als bei Erwachsenen (Dumpis *et al.*, 1999). Angesichts der Variabilität der klinischen Manifestationen, wird neuerdings vermutet, dass eventuell mehr als nur eine FSMEV-Variante in endemischen Regionen zirkuliert (Gritsun *et al.*, 2003) In Tabelle 6 sind die klinischen Manifestationen der FSMEV-Infektion dargestellt.

Tab. 6: Klinische Manifestationen einer FSMEV-Infektion (modifiziert nach Dumpis *et al.*, 1999).

Klinische Manifestation	Symptome
Fiebriger Verlauf ¹	Kopfschmerz, Fieber, Erbrechen, Vertigo, Photophobie, keine Anzeichen menigealer Irritation
Aseptische Meningitis	hohes Fieber, Erbrechen, Kopfschmerz, Vertigo, Photophobie, menigeale Irritation
Meningo-Enzephalitis	Anzeichen meningealer Irritation, Nystagmus, Somnolenz, asymmetrische Paresen, Hyperästhesie, Hyperakusis, Sprachschwierigkeiten, Schmerzen in Extremitäten und Rücken, Ohnmacht, profuses Schwitzen, Halluzinationen, Psychosen, Delirium
Meningo-Enzephalomyelitis	Anzeichen meningealer Irritation, nervale Dysfunktionen mit Paresen in Schultergürtel und Extremitäten

1: zuweilen auch als *febrile headache* bezeichnet

2.4.5. Erkrankung der Tiere mit FSMEV

In erster Linie ist das FSMEV als humanpathogenes Agens anzusehen. Es besitzt jedoch auch ein erhebliches pathogenes Potential für andere Säugetiere (Weissenböck *et al.*, 1998). Bislang wurde lediglich bei Hund und Pferd über eine klinische Manifestation berichtet, obgleich bei einer Vielzahl von Insektenfressern, Nagern, Wild- und Nutztieren Seropositivität nachgewiesen werden konnte (Sixl *et al.*, 1973; Waldvogel *et al.*, 1981; Tipold *et al.*, 1993; Reiner & Fischer, 1998).

FSMEV-Infektion beim Hund

Erstmals konnte im Jahr 1972 aus dem Gehirn eines Hundes, der klinisch durch zentralnervöse Störungen auffiel, FSMEV isoliert werden (Grěsiková *et al.*, 1972 a). Hunde scheinen für die Ausprägung klinischer Symptome weniger anfällig zu sein als Menschen. Bei einer experimentellen FSMEV-Infektion von sechs Hundewelpen führte die Infektion zwar zur Serokonversion, die Tiere erkrankten jedoch nicht (Grěsiková *et al.*, 1972 b). Handelt es sich aber um eine klinisch manifeste Infektion, so treten nach einer Inkubationszeit von 5- 9 Tagen die ersten Symptome in Erscheinung (Leschnik *et al.*, 2002). Der Krankheitsverlauf ist progressiv, verläuft beim Hund, im Gegensatz zum Menschen, in der Regel nicht biphasisch und ist durch eine höhere Mortalität gekennzeichnet. Bei perakutem Verlauf sterben die Tiere nach 3- 7 Tagen (Tipold *et al.*, 1993; Reiner *et al.*, 1999; Tipold, 2000). Die auftretenden Symptome, meist vergesellschaftet mit Fieber, weisen auf eine multifokale Beteiligung von Großhirn (Hirnnervendefizit, Tetraplegie, Tetraparese, Bewusstseinstörung), Kleinhirn (Hypermetrie, Hyperästhesie) und Rückenmark (Ataxie, Parese, Paralyse, Hyporeflexie) hin. Auffallend ist die Hyperalgesie im Halsbereich (Reiner *et al.*, 1999; Hartmann, 2000). Die histopathologischen und immunhistochemischen Befunde gehen mit den Symptomen konform (Weissenböck *et al.*, 1998). Überleben erkrankte Hunde die erste Woche, wird die Prognose deutlich günstiger. Bei akutem Krankheitsverlauf verbessert sich der klinische Zustand der Tiere nach 1- 3 Wochen und die Erkrankung heilt oft folgenlos aus. Ebenso wurde ein möglicher chronischer Verlauf beschrieben, bei dem betroffene Tiere bis zu sechs Monate zur vollständigen Rekonvaleszenz benötigten (Leschnik *et al.*, 2002).

FSMEV-Infektion beim Pferd

Über FSME-Erkrankungen beim Pferd ist bislang noch sehr wenig bekannt. Die erste Beschreibung bezüglich dieser Erkrankung beim Pferd stammt aus dem Jahr 1981 (Waldvogel *et al.*, 1981). Es werden hier neurologische Symptome verschiedenen Schweregrades beschrieben. So konnte bei Pferden, die an schweren neurologischen Ausfällen litten, Fieber, deutlich reduziertes Allgemeinbefinden mit Inappetenz, Bewusstseinstörung sowie Zittern und Zähneknirschen festgestellt werden. Die Tiere fielen auf durch ataktischen Gang, Krämpfe, Schreckhaftigkeit, Kreisbewegungen und Apathie bis hin zu Stupor. Verließ die Infektion jedoch chronisch, zeigten die Pferde meist nur geringgradige neurologische Defizite wie verzögerte Stell- und Haltungsreflexe, die binnen Wochen bis Monaten vollständig ausheilten (Waldvogel *et al.*, 1981; Luckschander *et al.*, 1999).

3. Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit verwendete Materialien sind im Anhang unter 10.1. aufgelistet.

3.1. Fangorte

3.1.1. Mäuse

Mäuse wurden in Gebieten bei Grafrath, Traunstein und Erlangen-Fürth gefangen (siehe Übersicht Abb. 9 und Karten A1- A9, Anhang Kapitel 10.3.). Traunstein und Erlangen-Fürth sind nach Angaben des RKI (Robert Koch Institut) bereits bei Fangbeginn als Risikogebiete für die FSME deklariert worden. Das Untersuchungsareal Grafrath (siehe Karten A8 / A9, Anhang Kapitel 10.3.) hingegen war zu Beginn dieser Arbeit vom RKI nicht als FSME-Risikogebiet bezeichnet. Bei Grafrath wurde die Beprobung eines im Wald gelegenen Gartengrundstückes (Außenstelle des Lehrstuhls für Tierökologie der TU München) in Kooperation mit Prof. Dr. W. Bäumler vom Lehrstuhl für Tierökologie der TU München durchgeführt. Im Landkreis Traunstein erfolgte eine Beprobung des Stadtwaldes (Bürgerwald), einer am Waldrand liegenden Wiese und eines Moorgebietes (Burkhartsöd), (siehe Karte A5- A7). Im Landkreis Erlangen-Fürth wurde ein Mischwald (Frauenaarach), ein Wasserschutzgebiet (Klosterholz) und ein Hügelwald (Diethofen) beprobt. Bei allen Fanggebieten befanden sich die beprobten Flächen in oder bei Naherholungsgebieten (Trimm-Dich-Pfaden, beliebte Spazierwege oder Wanderstrecken). Bei den Waldstücken handelte es sich vorwiegend um Laubwälder mit teilweise sehr dichtem Unterholz, häufig mit Brombeer-/ Himbeerbüschen und dichtem Springkraut-Bewuchs, was den jeweiligen Mauspopulationen ideale Lebensbedingungen verschafft. Wenn der Lebensraum in seiner Qualität als Schutzbieter und Nahrungslieferant verschlechtert wird, kann das negative Auswirkungen auf viele Kleinsäuger haben und zeigt sich beispielsweise in Nagerschäden (Küthe & Krämer, 1961). Da Nagerschäden für die Forstbestände ein großes Problem darstellen, erfolgt zeitweise der Einsatz von Rodentiziden. Dabei sind vor Ausbringung der Rodentizide Probefänge im jeweiligen Gebiet gesetzlich vorgeschrieben. In Absprache mit den jeweiligen Forstämtern sowie unter Anleitung von Prof. Bäumler, wurden im Rahmen der Forstschutzprognose Mäuse in den genannten Gebieten gefangen. Die Fangdaten wurden den Forstämtern übermittelt.

3.1.2. Zecken

Für die Untersuchung auf das Vorkommen des FSMEV in Zecken wurden nüchterne Zecken in drei Parkanlagen Münchens (Englischer Garten, Nymphenburger Park, Forstenrieder Park) und in Schöngeising (Lkr. Fürstenfeldbruck) gefangen (siehe Abb. 9 und Karten A8, A10, Anhang, Kapitel 10.3.). Die beprobten Parkanlagen liegen in Arealen, die bislang nicht zu den von RKI oder LGL (Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit) veröffentlichten Risikogebieten gehörten. Dieser Teil des Projekts wurde vom Bayerischen Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (STMUGV) als Pilotstudie gefördert.

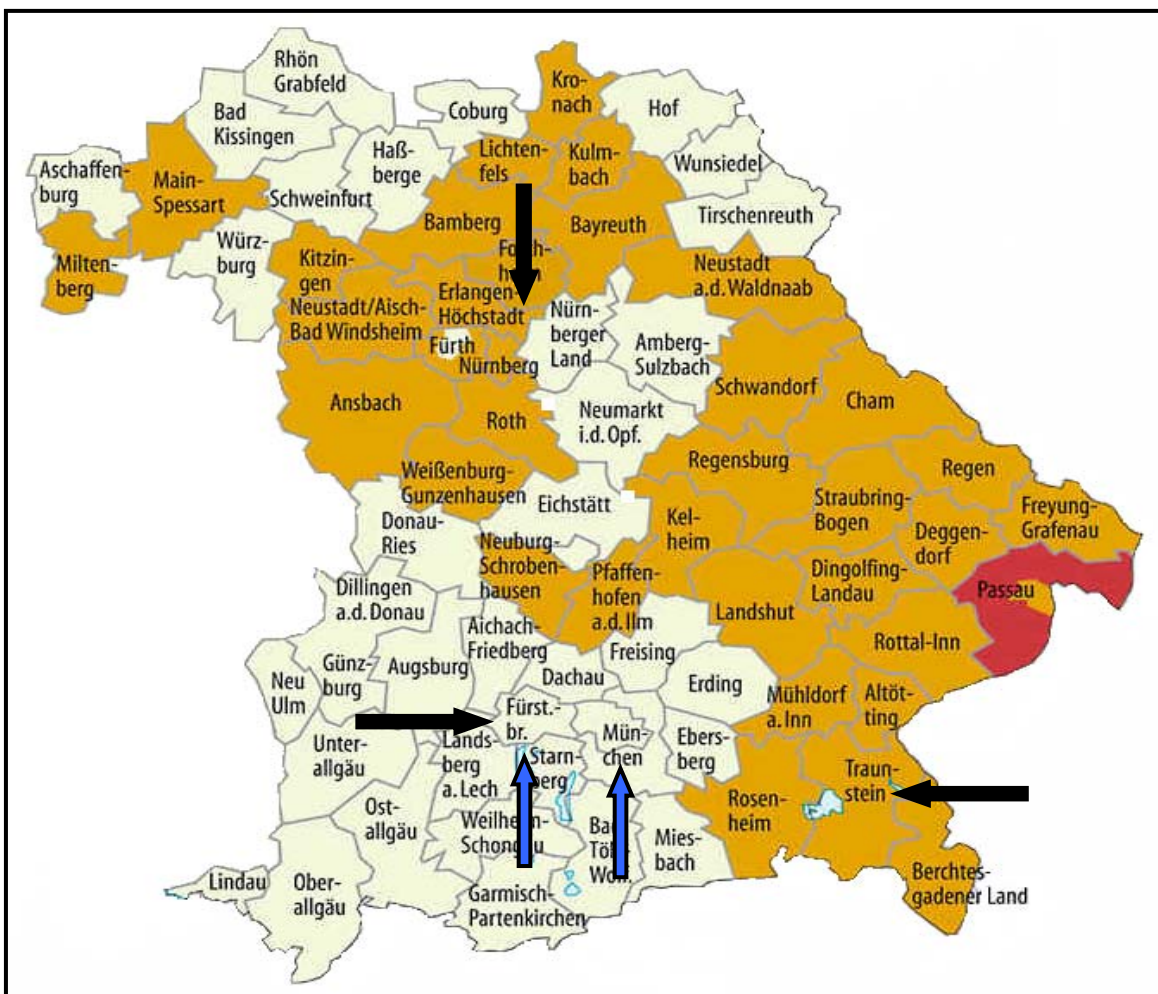


Abb. 9: Darstellung der Fanggebiete auf einer FSME-Risikogebietskarte Bayerns von 2002; schwarze Pfeile: Mausfanggebiete; blaue Pfeile Zeckenfanggebiete; rot: FSME-Hochrisikogebiet (modifiziert nach RKI „Risikogebiete der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) in Deutschland“, Epidemiologisches Bulletin Nr. 26 / 2002).

3.2. Fangmethodik

3.2.1. Mäuse

Die ausgewählten Fangflächen in Traunstein und Erlangen wurden im Turnus von drei Wochen im Rahmen von 2-Tagesfahrten von März bis einschließlich Oktober 2003 beprobt. Um die Wildmäuse zu fangen, wurde eine Vorködertechnik eingesetzt. Bei dieser Technik werden 500 ml Plastikbecher mit einem Köder (Apfelstücke, bevorzugte Sorte: Golden Delicious) versehen und in 10 Meter Abständen in mehreren, parallel zueinander verlaufenden Reihen ausgelegt. Da Mäuse ein ausgeprägtes Revierverhalten besitzen, werden Stellen, an denen sie gefressen haben, durch Harn- oder Kotabsatz markiert. Die Köderbecher wurden daher mindestens 24 Stunden nach der Ausbringung auf Faeces und Urinspuren überprüft. Markierte Köderbecher wurden durch köderbestückte Lebendfallen (Shermanfallen) ausgetauscht (Abb. 10). Die Kontrolle der Fallen auf eingefangene Tiere erfolgte dabei am Abend des selben Tages sowie am Morgen des darauffolgenden Tages. Am Abend des zweiten Fangtages wurden alle Fallen eingesammelt und wieder durch Köderbecher ersetzt. Gefangene Tiere wurden in Laborkäfige umgesetzt und nach München gebracht.



Abb. 10A: Sherman-Lebendfalle (Quelle: <http://www.patrickmarsh.org/trap.html>); B: Überprüfen der Köderbecher und Ersetzen der markierten Becher durch Sherman-Lebendfallen.

In Grafrath erfolgte die Beprobung der Gebiete stichprobenartig von 2001- 2003 mit der oben beschriebenen Methode durch Prof. Dr. W. Bäumler. Die hier gefangenen Tiere wurden dann, ebenfalls lebend, nach München ins Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät gebracht.

3.2.2. Zecken

Nüchterne Zecken wurden mit Leintüchern (sogenannten Fahnen) an mehreren Standorten in Parklandschaften Münchens (Englischer Garten, Nymphenburger Park, Forstenrieder Park sowie in Schöngeising bei Fürstenfeldbruck gefangen (Abb. 11A). Durch den taktilen Reiz des Tuches lassen sich die Zecken von der Vegetation abstreifen. Mit einer feinen Pinzette (Rubis) können sie sodann von der Fahne abgesammelt werden (Abb. 11B). Die eingefangenen Zecken wurden vor Ort nach Stadium (Larven, Nymphen, Adulte) und Geschlecht in 5- 10er Pools in 1,5 ml Mikro Tubes (Sarstedt, Nümbrecht) sortiert. Bei den gefangenen Tieren handelte es sich ausschließlich um Zecken der Art *Ixodes ricinus*. Um die Stabilität der viralen RNS zu gewährleisten, wurden die Zecken unmittelbar am Fangort auf Trockeneis verbracht und im Labor in München anschließend bei -70°C eingefroren.

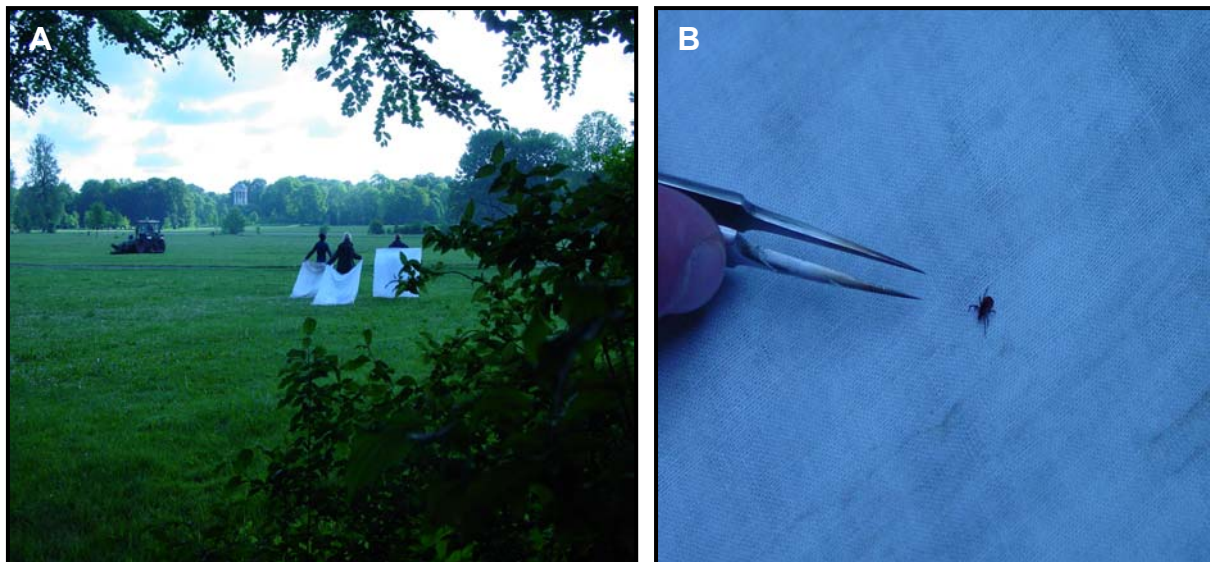


Abb. 11A: Zeckenfang mit Leintüchern in München, Englischer Garten; B: Gefangene Zecken werden mit Hilfe einer Pinzette vom Leintuch abgesammelt und dem Entwicklungsstadium entsprechend sortiert.

3.3. Aufarbeitung der Proben

3.3.1. Sektion der Wildmäuse

Am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät erfolgte die Tötung der Mäuse nach den Richtlinien über das fachgerechte und tierschutzkonforme Töten von Versuchstieren des Bundesamtes für Veterinärwesen mit CO₂ (Bundesamt für Veterinärwesen, Richtlinie Tierschutz 3.01, 1993). Alle Tiere wurden nach erfolgter Artbestimmung vermessen (Kopf-Rumpf-Länge; Kopf-Schwanz-Länge) und gewogen. Ebenso wurden sie, durch Kämmen mit einem Flohkamm, auf vorhandenen Ektoparasiten hin untersucht. Abgesammelte Parasiten wurden unmittelbar bei -70°C gelagert. In der anschließenden Sektion wurden jedem Tier Organproben von Ohren, Herz, Lunge, Milz, Leber, Gonaden, Nieren, Muskel, Harnblase sowie teilweise das Gehirn unter sterilen Bedingungen entnommen und unmittelbar nach der Entnahme bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

Während aller Sektionen wurde zum Schutz der Mitarbeiter vor Infektionen mit Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz und Schutzbrille gearbeitet.

3.3.2. DNS-Isolierung aus Mäuseohren

Für den Nachweis der Borrelien DNS aus Wildmäusen wurden die Ohren der Mäuse ausgewählt. Die Entscheidung, die Ohren für den Nachweis zu verwenden, wurde nach ausführlicher Literaturrecherche getroffen (z.B. Peavy *et al.*, 1997). Ein Vergleich von Arbeiten, in denen ebenfalls Mäuse auf Borrelien DNS hin untersucht wurden, zeigte, dass die DNS-Isolierung aus den Mäuseohren am erfolgreichsten scheint.

Um das Probenmaterial für die PCR verwenden zu können, war zunächst die Aufreinigung der Proben erforderlich. Hierfür wurde jeweils 0,025 g Ohrmaterial mit Proteinase K und ATL-Puffer (beides Qiagen, Hilden) versetzt und einem ca. 3 Stunden dauernden Verdau bei 56°C unterzogen (Thermomixer, Eppendorf). Aus diesem Lysat erfolgte die DNS-Isolierung mit Hilfe des QiaAmp[®] DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden dabei über im Kit enthaltene Säulen aufgereinigt. Potentiell in der Probe enthaltene DNS wird hier an eine Silica-Gel-Membran gebunden und gewaschen. Die Eluation der aufgereinigten Nukleinsäure erfolgte in 30 µl Eluationspuffer. Das Eluat wurde direkt bei -70°C aufbewahrt.

3.3.3. RNS-Isolierung aus Hirn und Milz der Mäuse

Auch hier wurden mittels Literaturrecherche die zu untersuchenden Organe ausgewählt (siehe Tabelle 28, Anhang, Kapitel 10.2.). Für die vorzunehmende Untersuchung erwiesen sich sowohl die Gehirne der Mäuse als auch deren Milzen als geeignet. Daher erfolgte die RNS-Isolierung aus 59 Mäusehirnen sowie aus 300 Milzen (repräsentativ aus allen Mausarten und Fangorten gewählt). Dabei wurden zunächst die Organproben (jeweils ca. 0,03 g/ Gehirn und 0,02- 0,08 g/ Milz) durch Schütteln mit Stahl-Kügelchen (4,5 mm, Luftgewehrmunition, Ernst Bloomfield, New York) mechanisch aufgeschlossen. Die Probengefäße wurden zu diesem Zweck in ein Mixermill-Gerät (Retsch[®], Haan) eingespannt und für 2 Min. 30 Sek. mit einer Frequenz von 23/Sek. geschüttelt. Durch diesen Vorgang wurden die Gewehrkerne derart in Rotation versetzt, dass das Organmaterial durch sie homogenisiert wurde. Um eine Erwärmung durch die starke Reibung während der Probenbehandlung zu vermeiden, wurden alle Gefäße sowie die mit den Probengefäßen in Berührung kommenden Geräteteile bei -20°C vorgekühlt. Die anschließende Isolierung der Nukleinsäure aus den Organhomogenisaten, nach Entfernung der Kügelchen, erfolgte wiederum mit einem kommerziell erhältlichen Extraktionskit (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen, Hilden). Das Prinzip der Isolierung basierte wiederum auf der selektiven Bindung der Nukleinsäure an eine Silica-Gel-Membran. Die Elution der aufgereinigten Nukleinsäure erfolgte in 30 μl RNase freiem Wasser. Die Eluate wurden bis zur Testung der Proben mittels PCR bei -70°C gelagert.

3.3.4. Aufarbeitung der gefangenen Zecken

Die gefrorenen Zecken wurden in sterilen 1,5 ml Mikro Tubes (Sarstedt, Nümbrecht) unter Zuhilfenahme von RNase freien Glaspistillen zermörsert. Um die Proben nicht zu hohen Temperaturen auszusetzen, wurden die Mikro Tubes während des Zerkleinerungsvorgangs in extra angefertigten, vorgekühlten Metallblöcken fixiert. Das zerkleinerte Zeckenmaterial wurde anschließend in RLT-Lysepuffer des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen, Hilden) aufgenommen. Um einen höheren Homogenisierungsgrad zu erreichen, wurde das Lysat zusätzlich ca. 10 Mal durch eine auf eine Spritze gesetzte 20G Nadel (Termo Europe, Leuven) gepresst. Die virale RNS aus den Proben wurde im Anschluß mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers gewonnen und unter Zugabe von 1 U Rnasin[®] (Promega, Madison) bis zur Verwendung in der PCR bei -70°C gelagert.

3.4. Erregernachweis mittels Polymerasekettenreaktion

3.4.1. Übersicht über die Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist eine 1984 von Kary Mullis entwickelte schnelle und sensitive Methode (US Patent 4.683.202) zum Nachweis von Virus Nukleinsäure (Stryer, 1996). Wenn die flankierenden Sequenzen einer Zielsequenz bekannt sind, ist es möglich mittels PCR Millionen Kopien der Zielsequenz zu erhalten. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten: a) Der Doppelstrangtrennung des ursprünglichen DNS-Moleküls durch kurzzeitiges Erhitzen auf 94°C, b) Hybridisierung der Primer (bekannte die Zielsequenz flankierenden Sequenzen) durch schnelles Abkühlen der Lösung und c) der DNS-Synthese, durch erneutes Erhitzen auf 72°C. Die genannten Schritte können durch Änderung des Temperaturprofils mehrmals hintereinander ablaufen. Während des Vorgangs neu gebildete DNS-Stränge dienen in folgenden Zyklen als Matrizen (Stryer, 1996). Da nur DNS als Matrize verwendet werden kann, muß, falls RNS-Proben verwendet werden sollen, den oben genannten Schritten die reverse Transkription vorangehen. Dafür wird die reverse Transkriptase benötigt, ein Enzym mit dessen Hilfe die Umschreibung viraler RNS in komplementäre cDNS ermöglicht wird.

Bei allen für diese Arbeit durchgeführten PCRs wurden die einzelnen Komponenten in einem sogenannten *Master-Mix* angesetzt. Dabei wird die Gesamtmenge, die für die geplanten PCR-Ansätze benötigt wird, zunächst in einem 1,5 ml Mikro Tube (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und anschließend (jeweils 24 µl) auf die einzelnen Reaktionsgefäße (Thermosprintplatte, Bilatec, Mannheim) verteilt. Diese Technik minimierte die Zahl der nötigen Pippetierschritte, was zur Reduktion der Kontaminationsgefahr führt. Ebenfalls wurde somit die gleichmäßige Verteilung der Reagenzien auf die Einzelproben erreicht. Die DNS / RNS-Proben (je 1 µl) wurden anschließend in einem separaten Raum unter einer Sicherheitswerkbank (Hera safe 12, Kendro, Hanau) dazugegeben. Alle Reaktionen wurden im „Primus 96 advanced Gradient“-PCR-Gerät der Firma peqLab (Erlangen) durchgeführt, wobei die Temperaturprofile der PCR-Programme den Schmelztemperaturen der jeweiligen Primerpaare angepasst wurde. Alle für die PCRs verwendeten Primer wurden von der Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert.

3.4.2. Gelelektrophorese

Um nach erfolgreicher Amplifikation entstandene PCR-Produkte sichtbar zu machen, werden diese zunächst durch Gelelektrophorese in einem, je nach Amplifikatgröße 1 %, 1,5 % bzw. 2,3 %igem, Agarosegel aufgetrennt. In die Kavitäten des erkalteten Agarosegels wurden jeweils 14 µl PCR-Probe versetzt mit 3 µl Ladepuffer (1:50) verdünnt (Sambrook & Maniatis, 1989) pipettiert. Als Längenstandard wurde ein 100 bp-Marker (BioLabs, Beverly) verwendet. Für die Auftrennung der Banden, bei der 1x TAE-Puffer (Sambrook & Maniatis, 1989) als Laufpuffer diente, wurde eine Spannung von 80 V an die Gelelektrophoresekammer angelegt. Anschließend wurden die Gele für 5 Min. in einem Ethidiumbromidbad (1 ‰) gefärbt. DNS-Banden wurden unter UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und die Ergebnisse mit einer monochromen CCD-Kamera (peqLab, Erlangen) dokumentiert.

3.4.3. Sequenzierungen

Positive PCR Produkte wurden zunächst mit einem kommerziell erhältlichen Kit (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden) aufgereinigt. Die Sequenzierung der gereinigten DNS erfolgte dann nach der Dideoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) bei der Firma GATC in Konstanz.

3.4.4. PCR zum Nachweis von Borrelien-spezifischer Nukleinsäuren

3.4.4.1. Primer

Um die Sensitivität zu erhöhen, wurde eine nested PCR etabliert. Bei dem Zielgen handelt es sich um das OspA- (*Outer surface Protein A*) Gen (Abb. 12).

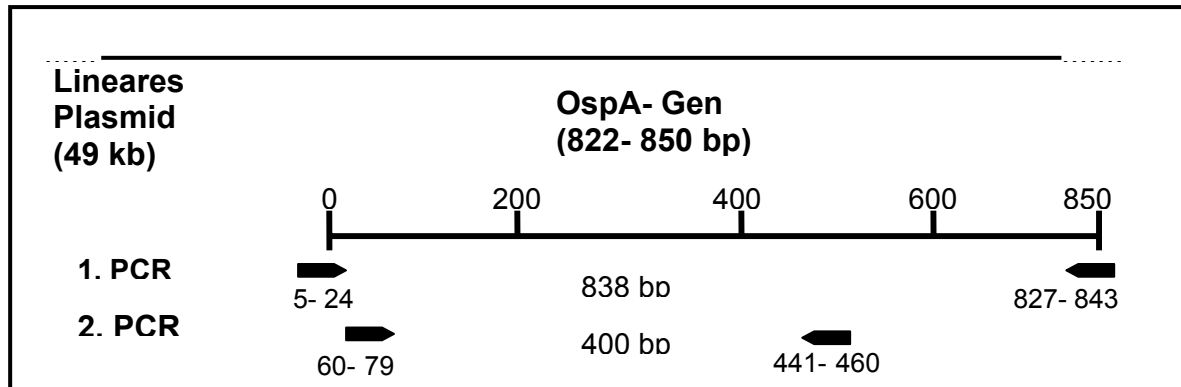


Abb. 12: Schematische Darstellung der Lage der Primer für die OspA-Gen spezifische 1. und 2. (nested) PCR.

Die Primer (Tab. 8) wurden in Anlehnung an von Zumstein (Zumstein *et al.*, 1992) und Huegli (Huegli *et al.*, 2002) bereits veröffentlichte Primer und anhand von Alignments von 28 Borrelien Stämmen entwickelt (Tab. 7), (Software DNA-Star, CLUSTAL W).

Tab. 7: Prinzip der Primerentwicklung (hier Hue1_3') an einigen Beispielsequenzen.

Stamm-Bezeichnung	Sequenz	Genbanknummer
<i>B. afzelii</i>GGAACCAA A CTTGAATAT A C....	X85982
<i>B. garinii</i>	...GGAACCA G ACTTGAATACAC....	Y10896
<i>B. burgdorferi</i>GGAACCAA A CTTGAATAT A C....	X80184
<i>B. valaisiana</i>GGAACCA G ACTTGAATACAC....	AF95943
<i>B. bisettii</i>GGAACCA G ACTTGAATACAC....	AF186845
<i>B. turdi</i>GGAACCA G ACTTGAATACAC....	AB016975
<i>B. burgdorferi</i>GGAACCA G GCTTGAATACAC....	X83622
=> PRIMER	GTRTATTCAAGYYTGGTTCC	
(revers komplementär)		

Hieraus ergeben sich die in Tabelle 8 dargestellte Konsensusprimer.

Die Primer der äußeren PCR liegen im Bereich der Nukleotide 5- 24 und 827- 843, die der nested PCR im Bereich der Nukleotide 60- 79 und 441- 460. Nach der äußeren PCR ergibt sich hieraus ein Produkt von 838 bp, aus der nested PCR resultiert ein 400 bp langes Amplifikat (Abb. 12).

Tabelle 8: Übersicht über die in der PCR zum Nachweis von Borrelien-spezifischen Nukleinsäuren verwendeten Primer.

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5'- 3')	Länge (nt)	Tm (°C)
1. PCR	OspAZum1_5	ATGAAAAAATATTTATTGGG	20	48,1
	OspAZum1_3	TCTCYTATTTTAAAGCG	17	48,75
2. PCR	OspAHue1_5	CAAATGTTAGCAGCCTTG	19	55,85
	OspAHue1_3	GTRTATTCAAGYYTGGTTCC	20	57,32

3.4.4.2. Konditionen

Bei der Etablierung der PCR wurden, um die Sensitivität zu verbessern, verschiedene Temperaturprofile sowie unterschiedliche Zusammensetzungen des Master-Mixes (z.B. Variationen in der MgCl₂-Konzentration, etc.) ausgetestet. Als optimal erwies sich folgender Master-Mix: Der für die 1. PCR sowie für die nested PCR verwendete Master-Mix enthielt 2,5 µl 10x Puffer S, 2 mM MgCl₂, eine 0,2 mM dNTP-Mischung, 0,4 mM von den jeweiligen Primern (Tab. 8) sowie 1,25 U Taq Polymerase (genannte Reagenzien peqLab, Erlangen). Jedem Reaktionsansatz wurde 1 µl aufgereinigte DNS zugesetzt.

Die 1. PCR beginnt mit einer 10 minütigen Denaturierung bei 94°C, gefolgt von einem weiteren Denaturierungsschritt bei 94°C, 1 Min. Dem Annealingschritt bei 58°C, 1 Min., schließt sich die DNS-Synthese bei 72°C, 1,20 Min. an. Diese Schritte werden in weiteren 10 Zyklen mit eingebautem Touch down (von 58°C auf 48°C in -1°C-Schritten) wiederholt. Diesem Touch down folgt ein sich 40x wiederholender Zyklus mit Denaturierung bei 94°C, 1 Min., Hybridisierung bei 48°C, 1 Min. und DNS Synthese bei 72°C, 1,20 Min. Abschließend werden die Reaktionsansätze für weitere 10 Min. bei 72°C inkubiert.

Das Profil der nested PCR entspricht nahezu dem der 1. PCR. Lediglich das Temperaturprofil unterscheidet sich. Der erste Annealingschritt erfolgt bei 54°C, der Touch down wird folglich in -1°C-Schritten von 54°C auf 44°C durchgeführt und der sich 40x wiederholende Zyklus läuft mit einer Annealingtemperatur von 44°C.

3.4.4.3. Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde bei dieser PCR aufgereinigte DNS des Stammes *Borrelia burgdorferi* sensu stricto verwendet. Um die Sensitivität und Spezifität der nested PCR zu ermitteln, wurden bei der Etablierung der PCR konsekutive Verdünnungsschritte (1:10) der in Tabelle 9 aufgeführten Borrelien-Stämme, die von Dr. Volker Fingerle vom Nationalen Borrelien-Referenzlabor des Pettenkofer-Institutes der LMU München zur Verfügung gestellt wurden, mit den oben beschriebenen Konditionen ausgetestet.

Tab. 9: Für die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der OspA Gen-spezifischen nested PCR verwendete Borrelien-Stämme (Michel et al., 2003).

Genospezies	Stamm- Bezeichnung	OspA-Typ	Genbanknummer
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Pka2	1	X80182
<i>B. afzelii</i>	pko	2	S48322
<i>B. garinii</i>	pBi	4	S48323
	PRab	4	n.b.
	pTrop	4	n.b.
	pBr	3	X80256
	pHei	5	X80251
	TN	6	X80252
	T25	7	X80254
<i>B. valaisiana</i>	VS116		AF095940
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB3		Y10839

n.b.= nicht bekannt

Ebenso sollte gewährleistet werden, dass die für das Probenscreening entwickelte PCR nicht durch Bestandteile des Probenmaterials selbst inhibiert würde. Daher wurden zunächst Ohrproben von Balb-c Mäusen entnommen und mit Verdünnungsreihen von 10^{-2} bis 10^{-5} der für das Borrelienscreening verwendeten Positivkontrolle, dem Borrelien-Stamm *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, gespikt. Diese Proben wurden im Folgenden wie gewöhnliche Screeningproben weiterverarbeitet, als Probe in die PCR eingesetzt und erneut die Nachweisgrenze ermittelt. Als weitere Kontrolle wurde eine, vom Landesuntersuchungsamt (LUA) in Oberschleißheim zur Verfügung gestellte, hochtitrige (mind. 10^6) Probe des Leptospirenstammes *L. patoc* in die PCR eingesetzt. Bei allen durchgeführten PCRs wurde Diethylpyrocarbonat-Aqua dest. (DEPC, Fulka, Neu-Ulm) als Negativkontrolle mitgeführt.

3.4.5. RT-PCR zum Nachweis der FSMEV-spezifischen RNS

3.4.5.1. Primer

Der Nachweis der FSMEV RNS erfolgte mittels einer Pan-FSMEV-nested RT-PCR. Die Zielsequenz ist das Hüllgen-Protein (Envelope (E)-Protein). Das E-Protein ist im Bereich der Nukleotide 971-2461 auf dem Polyprotein von FSMEV kodiert (Abb. 13).

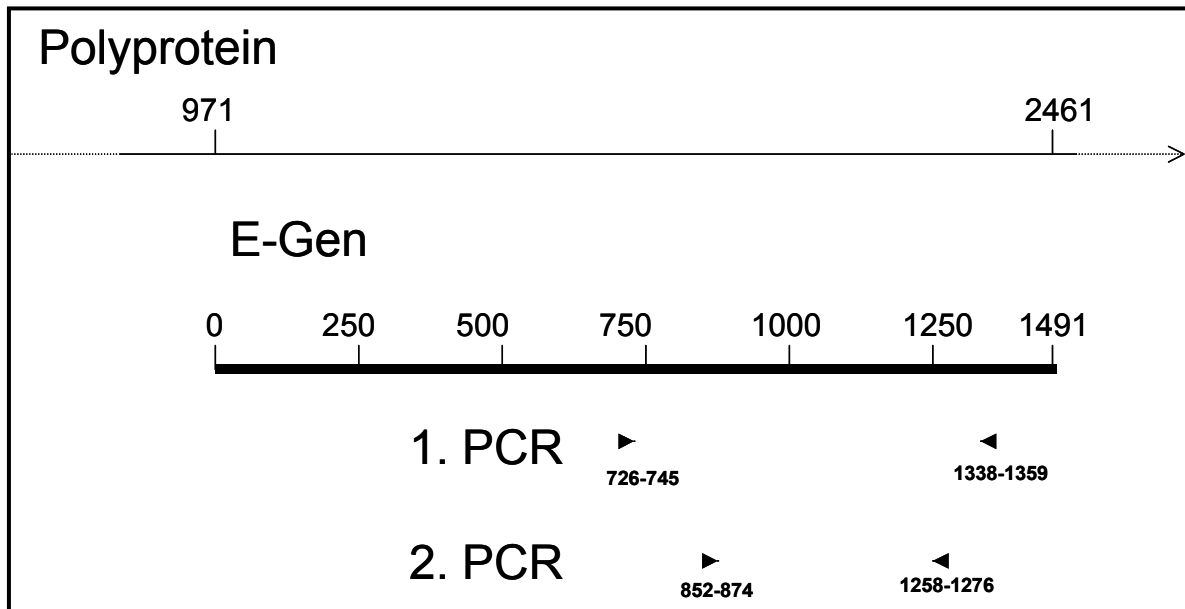


Abb. 13: Schema des Polyproteins von FSMEV und Lage der neu etablierten Primer für die E-Gen spezifische 1. und 2. (nested) PCR.

Die Primer (Tab. 11) wurden durch Vergleich von Sequenzdaten von 60 FSMEV-Stämmen aus 17 Ländern aus der Genbank erstellt (Software DNA-Star, Clustal W). Anschließend wurden auf Aminosäureebene konservierte Bereiche aus dem 1491 Nukleotide (497 Aminosäuren) langem Hüll (E)-Proteingen herausgearbeitet.

Um alle Stämme zu erfassen, mussten die Primer redundant angefertigt werden (Tab. 10). Die entwickelten Primer für die äußere PCR liegen auf dem Genom im Bereich der Nukleotide 1697-1716 und 2309-2330, die der nested PCR im Bereich 1823-1845 und 2229-2247 (Abb. 13). Somit ergeben sich für diese PCR 633 bzw. 424 bp große Amplifikate. Eine Übersicht über die zur Erstellung der Primer verwendeten Stämme gibt Tabelle 29, Anhang, Kapitel 10.2.).

Tab. 10: Prinzip der Primerentwicklung (hier TBE_ENV1A_red) an einigen Beispielsequenzen.

FSMEV Stamm	Sequenz	Genbanknummer
K23GAATTTGGGGCTCCTCAGGC.....	AF091010
ISOGAATTTGGGGCTCCTCAGGC.....	AF091009
SenzhangGAGTTTGGAGCTCCACATGC.....	AY174188
Langat env-1GAGTTTGGGACGCCTCATGC.....	NC003690
NeudörflGAATTTGGGGCTCCTCACGC.....	M27157
Oshima A-1GAGTTTGGAGCTCCACACGC.....	AB022293
VL99m11GAGTTTGGAGCTCCACATGC.....	AB049345
A52GAATTTGGGGCTCCTCACGC.....	X60286
SofjinGAGTTTGGAGCTCCACATGC.....	X07755
=> PRIMER	GARTTTGGRRCKCCDCAYGC	

Somit ergaben sich in Tabelle 11 dargestellte Konsensusprimer.

Tab. 11: Übersicht über die für die E-Protein-Gen-PCR verwendeten Primer.

Primer	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Länge Tm	
			(nt)	(°C)
1.PCR	TBE_ENV1A_red	GARTTTGGRRCKCCDCAYGC	20	64,16
	TBE_ENV2_red	CHACYCCYCCDARRAKGSTGTT	22	64,85
2. PCR	TBE_ENV4A_red	GRCCRAARTCCCASGCRTG	19	64,48
	TBE_ENV5_red	AGYGNAYGTDACHTGYGGRGT	22	63,91

3.4.5.2. Konditionen

Bei der Etablierung dieser RT-PCR sollten zunächst die optimalen Konditionen ermittelt werden. Daher wurde die Sensitivität der PCR mit logarithmischen Verdünnungsreihen von 10^0 bis 10^{-4} des Langkat-Virus bei verschiedenen $MgCl_2$ Konzentrationen sowie unterschiedlichen Zusammensetzungen des Master-Mixes und variierenden Temperaturprofilen bestimmt. Folgende Konditionen erwiesen sich als optimal: Für die äußere E-Protein-Gen spezifische RT-PCR wurde ein 2,5 μ l 10x Puffer Y enthaltender Master-Mix, versetzt mit 1 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP-Mischung, jeweils 0,4 mM der Primer TBE_ENV1A_red und TBE_ENV2_red sowie 1,25 U Taq Polymerase (alle genannten Reagenzien peqLab, Erlangen), 2,8 U RAV-2 (Amersham, Buckinghamshire) und 1 U RNasin[®] (Promega, Madison) enthaltender Master-Mix verwendet. Jedem Reaktionsansatz wurde 1 μ l aufgereinigte RNS zugesetzt. Der Master Mix der anschließenden nested PCR entspricht dem der 1. PCR, jedoch wurde für die nested PCR weder RAV-2, noch RNasin[®] zugegeben. Zudem wurden für die nested PCR die Primer TBE_ENV4A_red und TBE_ENV5_red in 4 mM Konzentration eingesetzt.

Das Programm der 1. PCR beginnt mit der eine Stunde dauernden reversen Transkription bei 42°C und der anschließenden Denaturierung bei 94°C für 5 Min. Der darauffolgende Zyklus, der sich aus einem weiteren Denaturierungsschritt bei 94°C für 30 Sek., einem 1 minütigen Annealingschritt bei 69°C sowie der DNS-Synthese bei 72°C für 1 Min. zusammensetzt, wird im Folgenden 10x mit einem Touch down von 69°C auf 59°C in -1°C Schritten wiederholt. Diesem Touch down folgt ein sich 40x wiederholender Zyklus mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sek., Hybridisierung bei 59°C für 1 Min. und der 1 minütigen DNS Synthese bei 72°C. Abschließend werden die Reaktionsansätze für weitere 10 Min. bei 72°C inkubiert.

Das Temperaturprogramm der nested PCR beginnt mit der Denaturierung bei 94°C für 5 Min.. Gefolgt wird die Denaturierung von einem sich 16x wiederholenden Zyklus mit eingebautem Touch down von 66°C auf 56°C in -0,5°C Schritten, der sich aus einer Denaturierung bei 94°C für 30 Sek., der Hybridisierung bei 66°C für 1 Min. und der Strangverlängerung bei 72°C für 1 Min. zusammensetzt. Danach durchlaufen die Reaktionsansätze zunächst 40x Zyklen mit je 30 Sek. bei 94°C, 1 Min. bei 56°C und 1 Min. bei 72°C, um abschließend für weitere 10 Min. bei 72°C bewahrt zu werden.

3.4.5.3. Kontrollen

Als Positivkontrolle wurde für diese PCR RNS von Langat-Virus (TBE-Virus-Gruppe, Fam. *Flaviviridae*) verwendet. Es handelt sich dabei um einen im Labor unter L2 Bedingungen kultivierbaren FSMEV-Stamm, der erstmals 1956 aus einer Zecke in Malaysia isoliert wurde (Smith *et al.*, 1956). Details hierzu sind Kapitel 3.6. zu entnehmen.

Um eine Inhibition durch organisches Probenmaterial auszuschließen, erfolgte zusätzlich die Bestimmung der Sensitivität unter Zugabe von negativem Organhomogenisat. Dazu wurden Gehirn- und Milzproben von Balb-c Mäusen entnommen und mit logarithmischen Verdünnungsreihen von 10^0 bis 10^{-4} des für die ENV-Gen spezifischen PCR als Positivkontrolle verwendeten Langat-Virus gespikt.

Die Inhibition sollte auch für Zeckenmaterial ausgeschlossen werden. Daher wurden FSMEV-negativ getestete Zecken ebenfalls mit konsekutiven Verdünnungen von 10^0 bis 10^{-4} des Langat-Virus gespikt. Diese Proben wurden im Folgenden wieder wie Screeningproben weiterverarbeitet, aufgereinigt in die PCR eingesetzt und abschließend ausgewertet. Als Negativkontrolle wurde bei allen durchgeführten PCRs Diethylpyrocarbonat-Aqua dest. (DEPC, Fulka, Neu-Ulm) mitgeführt.

3.5. Interne Kontrollen

3.5.1. Mäuse: Cytochrom b spezifische PCR

3.5.1.1. Primer

Um die Qualität der Mäuse-RNS zu überprüfen, wurde eine PCR verwendet, die die RNS des mitochondrialen Cytochrom b, ein sogenanntes *house-keeping*-Gen, als Zielgen hat.

Es war notwendig separate PCRs für Rötelmaus- und Feldmausproben (Arvicolidae), (Primer CB_F / CB_R) zum einen sowie für Gelbhalsmaus- und Waldmausproben (Muridae), (Primer H16 / L14648) zum anderen zu entwickeln.

Die Primer für die interne Kontroll-PCR der Arvicolidae liegen im Bereich der Nukleotide 1- 24 und 1117- 1143, die der Muridae im Bereich der Nukleotide 487- 510 und 1005- 1020 (Abb. 14).



Abb. 14: Lage der für das Cytochrom b-Gen mRNA spezifischen Primer der internen Kontrolle.

Das durch die Primer CB-F und CB_R amplifizierte RT-PCR-Produkt hat eine Größe von 1142 bp, das Produkt des Primerpaares H16 und L14648 hat eine Größe von 533 bp. Die verwendeten Primer (Tab. 12) wurden in Anlehnung an bereits veröffentlichte Sequenzen synthetisiert (Martin *et al.*, 2000; Kocher *et al.*, 1989; Dekonenko *et al.*, 2003).

Tab. 12: Übersicht über die für die internen Kontroll-PCRs (Gehirn- und Milzproben) der Mäuse verwendeten Primer (1= Dekonenko *et al.*, 2003; 2= modifiziert nach Kocher *et al.*, 1989; 3= Martin *et al.*, 2000).

Primer	Sequenz (5'- 3')	Länge (nt)	Tm (°C)	Referenz
CB_F	ATGACARTCATCCGAAARAAACAC	24	59,44	1
CB_R	TTARTCTAGGTCYAKRATGTYGTTTTTC	27	60,81	1
H16	CWGGTTGRCCTCCRATTCAWGT	22	62,67	2
L14648	TGAATYTGAGGRGGATTCTCAGTA	24	61,15	3

3.5.1.2. Konditionen

Zunächst erfolgte die Etablierung der PCR. Hierfür wurden unterschiedliche Master-Mix Zusammensetzungen, MgCl₂-Konzentrationen und Temperaturprofile getestet und miteinander verglichen. Als optimales Protokoll erwies sich folgendes: Für die Testung der Rötel- und Feldmausproben (Primer CB_F / CB_R) wurde ein 2,5 µl des 10x Reaktionspuffers S enthaltender Master Mix hergestellt, mit 0,45 mM dNTP-Mix, jeweils 0,4 mM der Primer CB_F und CB_R sowie 2 U Taq Polymerase (genannte Reagenzien peqLab, Erlangen), 2,8 U RAV-2 (Amersham, Buckinghamshire) und 4 U RNasin[®] (Promega, Madison).

Der Master-Mix, der für die Testung der Vertreter der Muridae (Gelbhals- und Waldmausproben) verwendet wurde, enthielt 2,5 µl des 10x Reaktionspuffers S, ebenfalls 0,45 mM dNTP-Mix, 1 mM MgCl₂, jeweils 0,4 mM der Primer H16 und L14648 sowie 1 U Taq Polymerase (genannte Reagenzien, peqLab, Erlangen), 2,8 U RAV-2 (Amersham, Buckinghamshire), 4 U RNasin[®] und 5 µl Enhancer Solution (peqLab, Erlangen). Jedem Reaktionsansatz wurde 1 µl aus Milz bzw. Gehirn der aus Mäusen isolierten RNS als Probe zugesetzt.

Aufgrund der ähnlichen Schmelztemperatur (T_m) der Primer konnte aber für die Arvicolidea- und Muridae- *housekeeping* mRNS PCR das selbe Temperaturprofil verwendet werden. Das Programm dieser internen Kontroll-PCR beginnt mit der hier 1,30 Std. dauernden reversen Transkription bei 42°C und der anschließenden Denaturierung bei 94°C für 5 Min.. Der darauffolgende Zyklus, der sich aus einem weiteren Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 Min., einem 1 minütigen Annealingschritt bei 60°C sowie der DNS-Synthese bei 72°C für 1,40 Min. zusammensetzt, wird im Folgenden 10x mit einem Touch down von 60°C auf 50°C in -1°C Schritten wiederholt. Diesem Touch down folgt ein sich 40x wiederholender

Zyklus mit Denaturierung bei 94°C für 1 Min., Hybridisierung bei 50°C für 1 Min. und der 1,40 Min. dauernden DNS Synthese bei 72°C. Abschließend werden die Reaktionsansätze für weitere 10 Min. bei 72°C inkubiert.

3.5.1.3. Kontrollen

Diethylpyrocarbonat-Aqua dest. (DEPC, Fulka, Neu-Ulm) wurde auch hier bei jeder PCR als Negativkontrolle verwendet.

3.5.2. Zecken: mitochondriale 16S RNS spezifische PCR

3.5.2.1. Primer

Um die Qualität der aus Zecken extrahierten RNS zu überprüfen, wurde eine PCR verwendet, die die mitochondriale 16S RNS von Zecken als Zielort hat. Die dafür eingesetzten Primer (Tab. 13) wurden aus einer Publikation von Schwaiger und Cassinotti (2003) übernommen. Die Primer binden im Bereich der Nukleotide 254-282 bzw. 327-351 und amplifizieren ein 97 bp großes Fragment (Abb. 15).

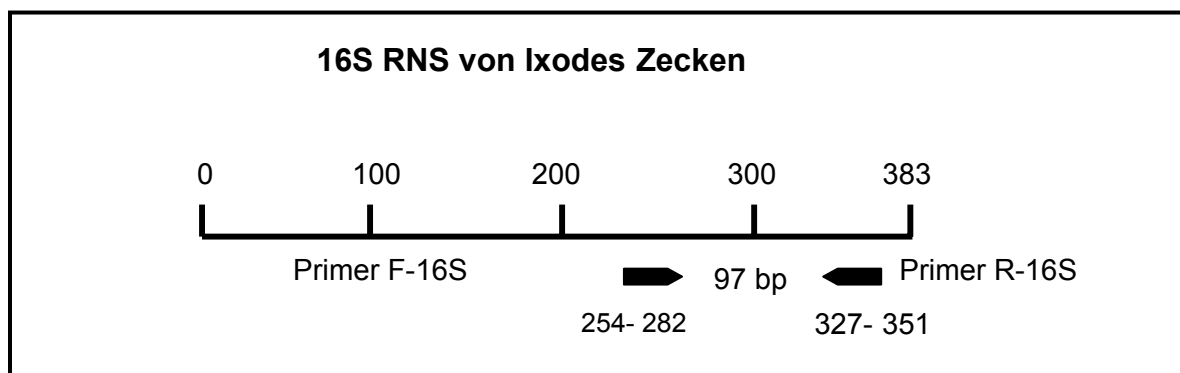


Abb. 15: Lage der für die 16S RNS von Zecken spezifischen Primer, der internen Kontroll-RT-PCR.

Tabelle 13: Übersicht über die für die interne Kontroll-PCR der Zeckenproben verwendeten Primer (Schwaiger & Cassinotti, 2003).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Länge (nt)	Tm (°C)
F-16S	AAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAA	29	60,38
R-16S	ACCAAAAAGAATCCTAATCCAACA	25	58,02

3.5.2.2. Konditionen

Bei der Etablierung der PCR wurden, um die Sensitivität zu verbessern, verschiedene Temperaturprofile sowie unterschiedliche Zusammensetzungen des Master-Mixes mit wechselnden $MgCl_2$ -Konzentration ausgetestet. Als optimal erwies sich folgendes: Der wiederum 2,5 μ l 10x Reaktionspuffer S enthaltende Master-Mix enthielt 0,1 mM dNTP-Mix, jeweils 0,4 mM der Primer F-16S und R-16S, 1,25 U Taq Polymerase (Reagenzien peqLab, Erlangen), 2,8 U RAV-2 (Amersham, Buckinghamshire) sowie 4 U RNasin[®] (Promega, Madison). Jedem Reaktionsansatz wurde 1 μ l aus Zecken isolierte RNS als Probe zugesetzt.

Das Programm dieser internen Kontroll-PCR wird mit der reversen Transkription bei 42°C für eine Stunde begonnen. An diese schließt sich ein Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 Min. an. Der darauffolgende Zyklus, der sich aus einem erneuten Denaturierungsschritt bei 94°C für 30 Sek., einem ebenfalls 30 Sek. dauernden Annealingschritt bei 66°C sowie der DNS-Synthese bei 72°C für weitere 30 Sek. zusammensetzt, wird im Folgenden 10x mit einem Touch down von 66°C auf 56°C in -1°C Schritten wiederholt. Diesem Touch down folgt ein sich 30x wiederholender Zyklus mit Denaturierung bei 94°C für 30 Sek., Hybridisierung bei 56°C für 30 Sek. und der wiederum 30 Sek. dauernden DNS Synthese bei 72°C. Abschließend werden die Reaktionsgemische für weitere 10 Min. bei 72°C inkubiert.

3.5.2.3. Kontrollen

Bei allen durchgeführten PCRs wurde Diethylpyrocarbonat-Aqua dest. (DEPC, Fulka, Neu-Ulm) als Negativkontrolle mitgeführt.

3.6. Zellkultur und Virusanzucht

3.6.1. Zellkultur

Für die Anzucht des für die Env-Gen-PCR als Positivkontrolle verwendeten Langat-Virus wurden die permanent wachsenden Schweinenierenzellen PK₁₅-Zellen (*porcine kidney*-Zellen, RIE 5-1) verwendet. Bei PK₁₅-Zellen handelt es sich um epitheloide, regelmäßige, polygonale Zellen, die in gut begrenzten Kolonien wachsen. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in (175 cm²) Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) bei 37°C. Als Nährmedium wurde Dulbeccos *Minimal-Essential-Medium* (DMEM, Biochrom, Berlin) unter Zusatz von 1% *Nonessential Amino Acids* (NEA, Biochrom, Berlin), 1 % NaHCO₃ (8,8%, Merck, Darmstadt), 5 % inaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin) sowie Antibiotika (100.000 I.E./l Penicillin, Grünenthal, Aachen und 100 mg/l Streptomycin, (PHARMA, Wernigerode) verwendet. Konfluente Zellen wurden regelmäßig unter Verwendung von Saline-Trypsin-Versene-Lösung Konzentration (STV) subkultiviert.

3.6.2. Kryokonservierung von Zellen

Um die langfristige Lagerung von Zellen zu ermöglichen, wurden ca. 1x 10⁶ abzentrifugierte Zellen (49. Passage) in 1,5 ml Kulturmedium unter Zusatz von 20 % FKS (Biochrom, Berlin) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO), (Sigma, Deisenhofen) resuspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) bei -180°C konserviert.

3.6.3. Viruspropagierung in Zellkultur, Isolierung viraler RNS

In der oben beschriebenen Schweinenieren-Zelllinie wurde das Langat-Virus vermehrt. Dazu wurde bei, in einer 175 cm² Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) angezüchteten, zu ca. 90 % konfluenten Zellen das Medium dekantiert und die Zellen mit 3 ml Virus (21. Passage) infiziert. Zur Virusadsorption wurden die Zellen für 30 Min. bei 37°C belassen und anschließend mit frischem Medium (2 % FKS) versorgt. Das Virus vermehrte sich unter Ausbildung einer generalisierten Lysis. Die Virusernte erfolgte nach 4- 6 Tagen. Aus dem virushaltigen Zellkulturüberstand wurde die RNS mit dem RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert.

3.6.4. Virustitration

Um die TCID₅₀ der konzentrierten Virussuspension zu bestimmen, wurde eine Titration durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁷ angelegt und davon je 100 µl im Dreifachansatz auf konfluente PK₁₅-Zellen in 24-Loch Platten (Nunc, Wiesbaden) gegeben. Am 7. Tag p. i. erfolgte die Ablesung. Aus der Anzahl der ermittelten positiven Vertiefungen pro Verdünnungsstufe wurde der Virustiter errechnet.

3.7. Datenanalysen

3.7.1. Sequenzanalysen

Sequenzanalysen und Translation von Nukleotid Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms Lasergene DNASTar (DNASTAR.INC., Madison, USA) erstellt. Durch Sequenzierung der positiven Screeningproben erhaltene Sequenzkurven wurden mit der Software Chromas[®] 1.45 (McCarty C., 1998; <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) sowie DNASTar ausgewertet und anschließend mit bereits veröffentlichten Sequenzen über das BLAST verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>; Altschul *et al.*, 1997). Alignments wurden mit Clustal W angefertigt. Anhand dieser Daten, konnten die Genospezies der ermittelten Sequenzen festgestellt werden.

3.7.2. Phylogenetische Analysen

Für die Erstellung der Phylogenie wurden bereits veröffentlichten Sequenzen der unterschiedlichen Erregersubtypen aus der Genbank ermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>).

Phylogenetische Analysen wurden mit Hilfe der Programme SEQBOOT, DNAPARS und CONSENSE erstellt (Felsenstein J., 1989; Version 3.61.), phylogenetische Stammbäume mit Maximum Parsimony (bootstrap 100) entwickelt und mit dem Programm Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) dargestellt. Im Vorfeld wurden mittels Alignments identische Sequenzen ermittelt.

3.7.3. Datenerfassung und Statistik

Karten wurden mit Top 50 Version 3.0 dargestellt (Bayerisches Landesvermessungsamt München, Bundesamt für Kartographie und Geodäsie 2001; Software: Dornier GmbH 2001).

Daten der Mäuse wurden in SPSS (Leipniz-Rechenzentrum, LRZ, Version 12.0.1) erfasst. Gruppenvergleiche erfolgten mit dem Chi-Quadrat Test. Chi-Quadrat (X^2) und die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) werden entsprechend angegeben. Des Weiteren wurden der T-Test sowie der Levene Test angewendet. Die Berechnung erfolgte mit SPSS. Für die Berechnung der maximal möglichen Vorkommenshäufigkeit (= p) beim Fehler 1. Art wurde folgende Formel angewendet:
$$p \leq 1 - \alpha^{1/n}.$$

4. Ergebnisse

4.1. Fangergebnisse

4.1.1. Zecken

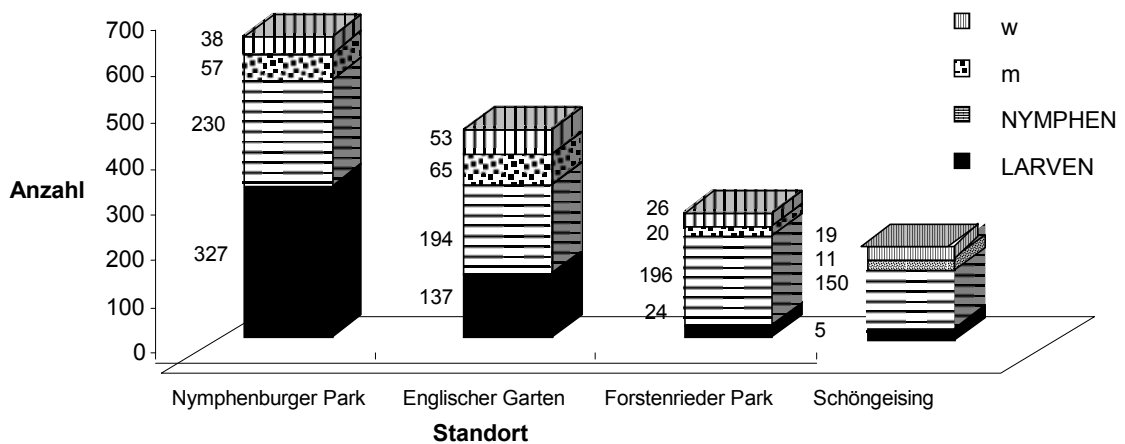
Insgesamt konnten 1552 Zecken (212 Pools), (Tab. 14, Abb. 16) in den drei öffentlichen Parkanlagen Münchens, dem Englischen Garten, dem Nymphenburger Park, dem Forstenrieder Park und dem Gebiet in Schöngeising gefangen werden. Tabelle 14 gibt die Verteilung der untersuchten Zecken in den vier Fanggebieten wieder.

Tab. 14: *I. ricinus*, gefangen in drei Parkanlagen Münchens (Anzahl der gebildeten Pools in Klammern angegeben).

FANGGEBIET	LARVEN	NYMPHEN	♂	♀	SUMME
Nymphenburger Park	327 (33)	230 (24)	57 (14)	38 (10)	652 (81)
Englischer Garten	137 (15)	194 (15)	65 (17)	53 (16)	449 (63)
Fürstenrieder Park	24 (3)	196 (21)	20 (5)	26 (7)	266 (36)
Schöngeising	5 (1)	150 (16)	11 (3)	19 (4)	185 (24)
SUMME	493	770	153	136	1552

In Abbildung 16 A und 16 B erfolgt die grafische Darstellung dieser Ergebnisse.

A



B

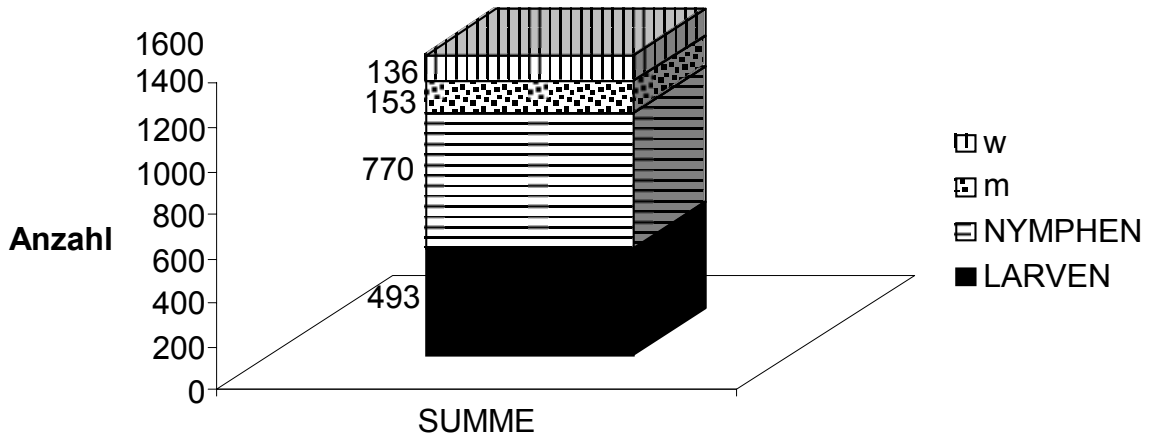


Abb. 16: Graphische Darstellung der Verteilung der gesammelten Zecken in den vier untersuchten Gebieten (A) und insgesamt (B) (w= weiblich, m= männlich).

Ergebnisse

4.1.2. Mäuse

An den unterschiedlichen Standorten konnten nach Vorköderung insgesamt 836 Mäuse mit Sherman Lebendfallen gefangen werden. In Tabelle 15 sind die Fangergebnisse zusammenfassend dargestellt.

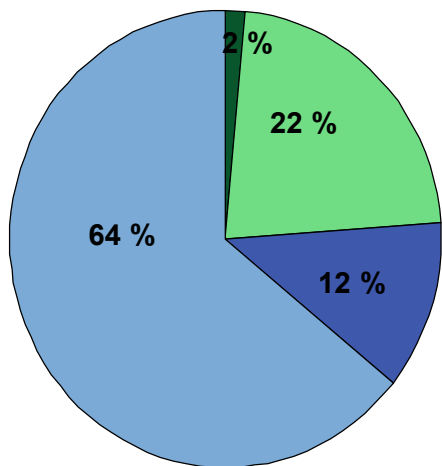
Tab. 15: Darstellung der insgesamt gefangenen Mäuse (Fm= Feldmaus; Ghm= Gelbhalsmaus; Rm= Rötelmaus; Schm= Schermaus; Erdm= Erdmaus).

Fangort	Fangfläche	Ghm.	Rm.	Fm.	Wm.	Schm.	Erdm.	sonstige	Gesamt
Erlangen	Dietenhofen	23	33	1	0	0	0	1	58
	Frauenaarach	28	17	0	0	0	0	3	48
	Garten	1	0	0	0	0	0	0	1
	Kernmühle	4	6	0	0	0	0	0	10
	Möhrendorf	3	2	0	0	0	0	0	5
	Gesamt	59	58	1	0	0	0	4	122
Grafrath	Garten	267	233	59	43	2	1	1	606
	Gesamt	267	233	59	43	2	1	1	606
Traunstein	Bürgerwald	1	12	0	0	0	0	0	13
	Burkhartsöd	2	3	0	0	0	0	0	5
	Geising	4	24	4	0	0	0	0	32
	Wiese	1	4	11	0	0	1	0	17
	Gesamt	8	43	15	0	0	1	0	67
Freising	Thalhausen	1	8	0	0	0	1	0	10
	Hr. Faht	3	0	0	0	0	0	0	3
	sonstige	2	0	0	0	0	0	0	2
	Gesamt	6	8	0	0	0	1	0	15
Raitenhaslach	Küche	1	0	0	0	0	0	0	1
	Gesamt	1	0	0	0	0	0	0	1
Institut	Damen-WC	0	0	0	2	0	0	0	2
	Gesamt	0	0	0	2	0	0	0	2
Ulm	Garten	0	1	0	1	0	0	0	2
	Gesamt	0	1	0	1	0	0	0	2
Breitasch	Garten	0	0	0	2	0	0	0	2
	Gesamt	0	0	0	2	0	0	0	2
Ramersdorf	Mittlerer Ring	3	0	0	0	0	0	0	3
	Gesamt	3	0	0	0	0	0	0	3
Oberschleißheim	Kuhstall	2	0	0	0	0	0	0	2
	Gesamt	2	0	0	0	0	0	0	2
Pommersfelden	sonstige	1	3	0	2	0	0	0	6
	Gesamt	1	3	0	2	0	0	0	6
Mehring	Reitstall	2	0	0	0	0	0	0	2
	Gesamt	2	0	0	0	0	0	0	2
Singen	Garten	1	0	1	4	0	0	0	6
	Gesamt	1	0	1	4	0	0	0	6
Gesamt		350	346	76	54	2	3	5	836

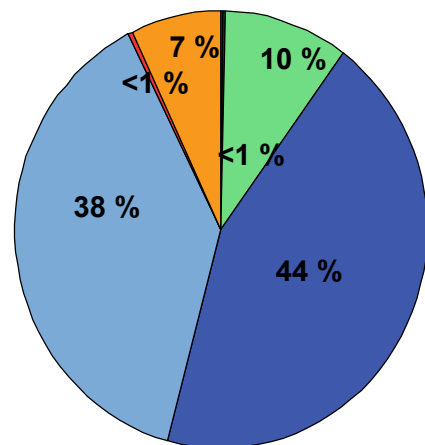
Ergebnisse

Bei der Verteilung der einzelnen Mausarten auf die Fangorte fällt auf, dass der Anteil an gefangenen Muridae (Langschwanzmäuse wie Gelbhals- und Waldmaus) ungefähr genauso groß ist, wie der an Arvicolidae (Kurzschwanzmäuse wie Rötel-, Feld- und Erdmaus). Lediglich für das Fanggebiet Traunstein trifft dies nicht zu. Hier war der Anteil an Langschwanzmäusen deutlich geringer (Abb. 17).

Fangort= Traunstein



Fangort= Grafrath



Art

- Erdmaus
- Feldmaus
- Gelbhalsm.
- Rötelmaus
- Waldmaus
- Scherm Maus
- sonstige

Fangort= Erlangen

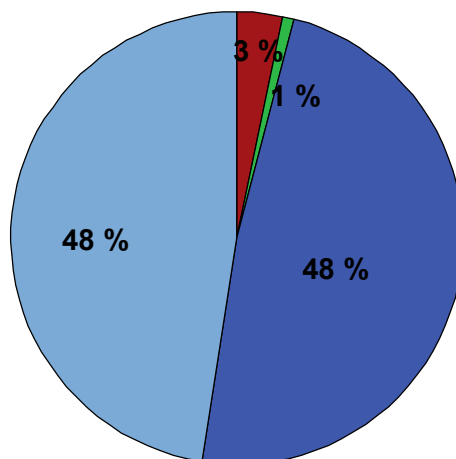


Abb. 17: Artenzusammensetzung, angegeben in Prozent, in den Fanggebieten Traunstein, Grafrath und Erlangen.

4.2. Ergebnisse der Untersuchungen im Zusammenhang mit FSMEV

4.2.1. Anzucht des Langat-Virus auf PK₋₁₅ Zellen

Als Positivkontrolle wurde das Langat-Virus, ein unter L2 Bedingungen kultivierbarer FSMEV-Stamm verwendet. Der Stamm vermehrt sich zytopathogen in permanenten Schweinenierenzelllinien (Abb.18). Titrations des Virus auf PK₋₁₅ Zellen resultierten in unserem Labor in Titern bis zu 10⁶ TCID₅₀/ml.

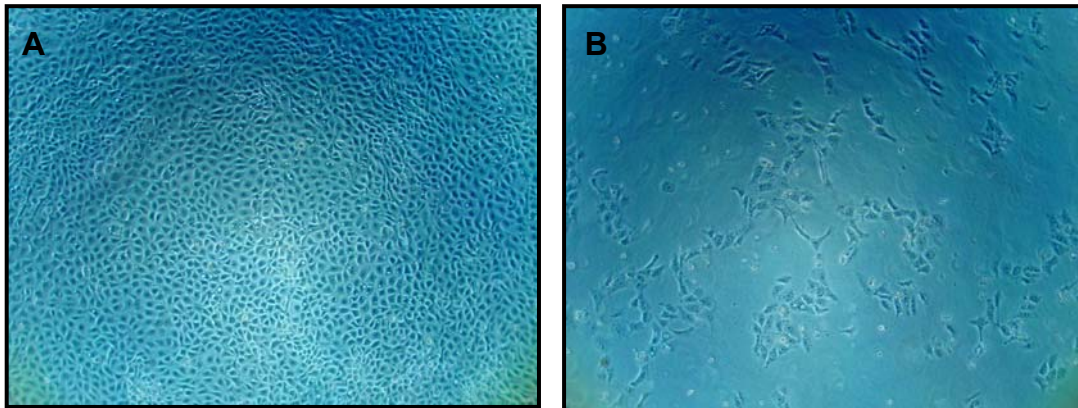


Abb. 18: Schweinenierenzelllinie (Pk₋₁₅) A: Mock; B: mit Langkat-Virus infiziert, 96 h. p.i..

4.2.2. Etablierung und Optimierung der E-Protein- Gen spezifischen nested RT-PCR

Um die optimalen Konditionen für die neu entwickelte Pan-RT-nested PCR zu ermitteln, wurden zunächst unterschiedliche Ansätze getestet. In Abb. 19 ist exemplarisch ein PCR Ansatz dargestellt, in dem verschiedene MgCl₂ Konzentrationen in Kombination mit unterschiedlichen Temperaturprofilen ausgetestet wurden. So wurde in der 1. RT-PCR mit MgCl₂-Konzentrationen von 1 mM, 1,5 mM und 3 mM gearbeitet. Für die nested PCR wurde eine MgCl₂-Konzentration von 1,5 mM gewählt. Mit den optimal ermittelten Konditionen konnte bei dieser nested PCR 0,4 TCID₅₀ Langkat-Virus nachgewiesen werden. Hier ist zu sehen, dass eine PCR, die mit suboptimalen Konditionen durchgeführt wird, eine deutlich niedrigere Sensitivität aufweist, als eine optimierte PCR. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 20, eine optimierte PCR dargestellt.

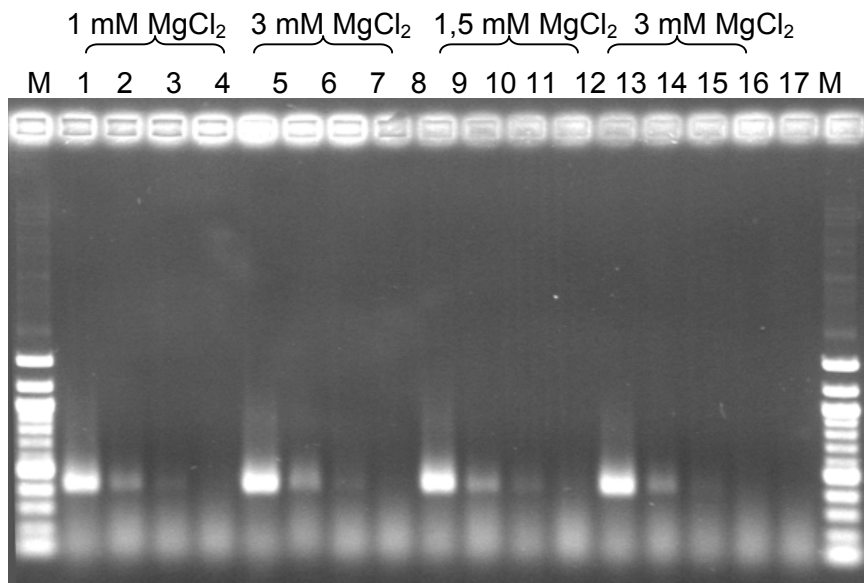


Abb. 19: Etablierung der E-Gen spezifischen Pan-RT-nested PCR, 1,5 %iges Agarosegel. Die 1. PCR wurde mit variierenden $MgCl_2$ -Konzentrationen angesetzt (in Klammern angegeben); die nested PCR wurde mit 1,5 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Die nested PCR wurde bei den Proben 1-8 mit einem Touch down von 68°C auf 58°C, Proben 9- 16 mit einem Touch down von 66°C auf 56°C durchgeführt. (M= 100 bp Marker, Spuren 1-4, 5-8, 9-12, 13- 16= jeweils Verdünnungen Langat- Virus 10^0 - 10^{-3} , Spur 17= Negativkontrolle).

4.2.3. Sensitivität und Spezifität der Nachweisverfahren

Die neu etablierte E-Gen spezifische RT-PCR ist hochsensitiv. Um die Nachweisgrenze der PCR zu erhöhen, wurde mit einem Touchdown Schritt beim Annealing gearbeitet. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren bei der RNS Isolierung und Einsatz in eine PCR Reaktion wurde mit der als optimal ermittelten Methodik die Nachweisgrenze errechnet. Es gelang hierbei 0.4 TCID₅₀ Langat-Virus pro Reaktion nachzuweisen.

Um die Empfindlichkeit oder auch inhibitorische Faktoren der neu etablierten Methode auch in Zecken zu überprüfen, wurden Zeckenlarven, -nymphen, -männchen und -weibchen jeweils mit dem FSMEV-Stamm Langat gespikt. Die Nachweisgrenze erhöhte sich bei den adulten Tieren um einen Faktor von 10 (0.04 TCID₅₀ Langat-Virus pro Reaktion, Abb. 20).

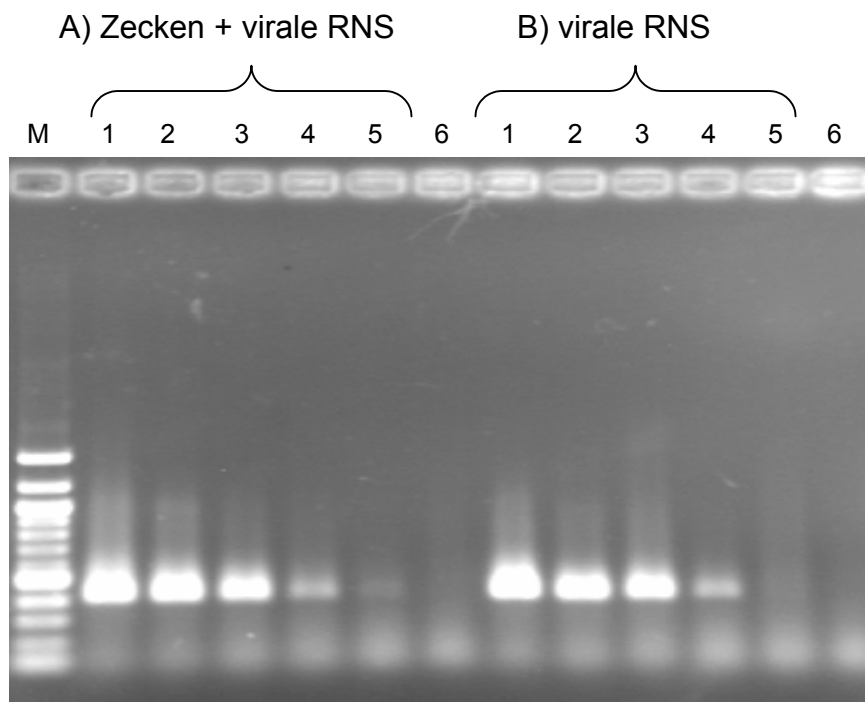


Abb. 20: Nachweisgrenze der neu etablierten Hüllgen-RT-PCR, 1,5 %iges Agarosegel. A) Langat-Virus gespikte Zeckenweibchen, B) Verdünnungsreihe von Langat-Virus, (Spuren 1- 5, Verdünnungen von Langat-Virus 10^0 – 10^{-4} TCID₅₀, 6= Negativkontrolle, M= 100 bp Marker).

Ebenso sollte ausgeschlossen werden, dass die Hüllgen-Protein-spezifische PCR durch Bestandteile von Milz oder Gehirn inhibiert würde. Hier wurden die entsprechenden Organe von Balb-c Mäusen mit Verdünnungsstufen von 10^{-1} bis 10^{-4} des Langat-Virus gespikt. Auch in mit Langat-Virus gespikten Mäuseorganen wird die Nachweisgrenze von 0.4 TCID₅₀ Langat-Virus pro Reaktion erreicht (Abb.21).

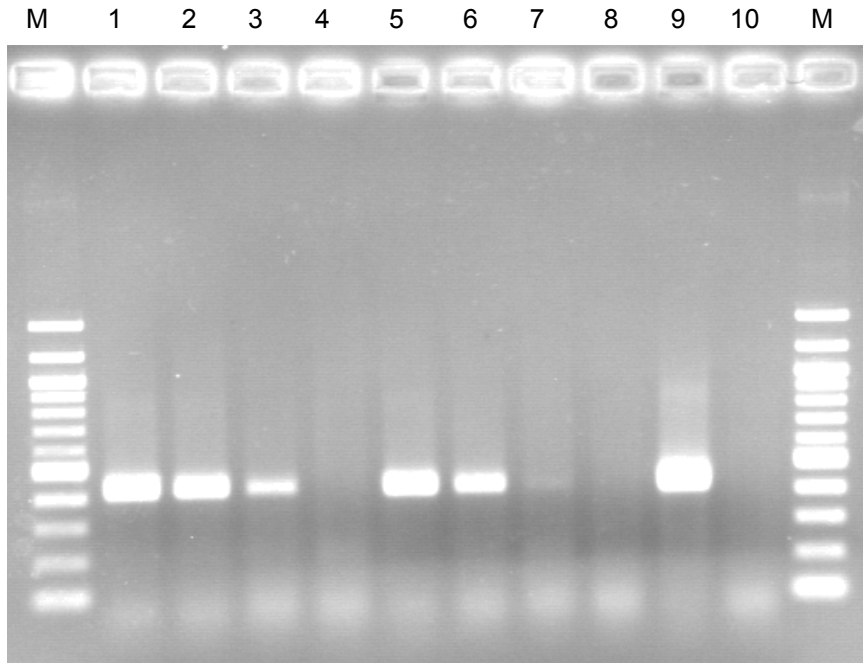


Abb. 21: Nachweisgrenze der neu etablierten Hüllgen-RT-PCR bei mit Langat-Virus gespikten Mausorganen, 1,5 %iges Agarosegel, (M= 100 bp Marker; Spuren 1- 4: Maushirn, Spuren 5- 8: Mausmilz, jeweils gespikt mit Verdünnungsreihe 10^{-1} – 10^{-4} TCID₅₀ von Langat-Virus; Spur 9= Positivkontrolle Langat-Virus 10^0 ; Spur 10= Negativkontrolle).

4.2.4. Ergebnis der PCR Untersuchungen an Zecken auf FSMEV

Es konnte in keinem der 212 untersuchten Zeckenpools FSMEV-positive Proben, mittels der etablierten Hüllgen-RT-PCR, ermittelt werden. Bei der unter gegebenen Bedingungen gesammelten Zecken kann statistisch die Prävalenz bei einer 95 % Wahrscheinlichkeit mit $< 0,2 \%$ angegeben werden (berechnet mit der Formel $p \leq 1 - \alpha^{1/n}$).

4.2.4.1. Interne Kontrolle der aus Zecken isolierten RNS

Um dieses negative Ergebnis zu kontrollieren wurde eine interne Kontrolle, die für die 16 S RNS von Zecken spezifische RT-PCR durchgeführt.

Auch bei dieser PCR wurden zunächst die optimalen Bedingungen ermittelt. In Abb. 22 sind wiederum exemplarisch, PCR-Ansätze dargestellt, die im Rahmen der Etablierung durchgeführt wurden. Gut zu erkennen ist, dass sich in einem Ansatz mit 0 mM MgCl₂ saubere Banden im Agarosegel ergeben, wohingegen ein PCR-Ansatz mit 3 mM MgCl₂ zu starken Hintergrundbanden führt, die eine Auswertung erschweren würden.

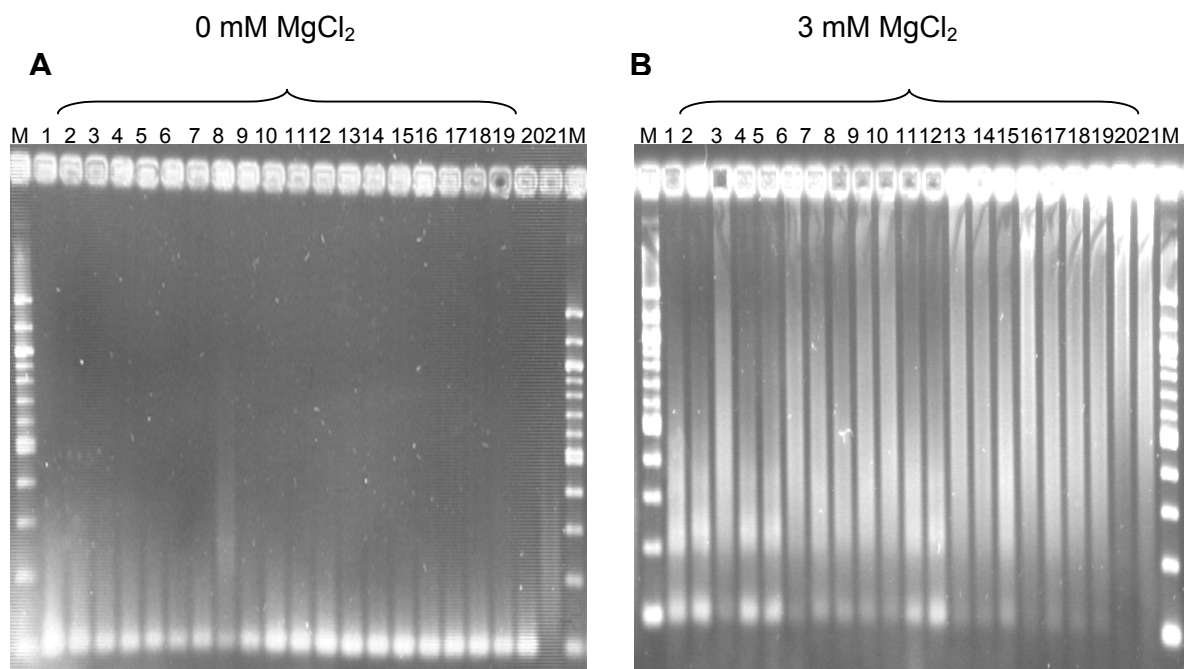


Abb. 22: Etablierung und Optimierung der internen Kontroll-PCR, spezifisch für die 16S RNS von Zecken, 2,3 %iges Agarosegel. A: 0 mM MgCl₂, B: 3 mM MgCl₂. Spuren 1-5= weibliche Zeckenpools, Spuren 6-10= männliche Zeckenpools; Spuren 11- 15= Nymphenpools; 16- 20= Larvenpools, 21= Negativkontrolle, M = 100 bp Marker.

Nach Optimierung der Konditionen, erfolgte für jede Probe, die mit der E-Gen spezifischen RT-nested PCR auf spezifische Nukleinsäuren hin untersucht wurde, parallel die Durchführung der internen Kontroll RT-PCR.

Abbildung 23 zeigt exemplarisch für die Zeckenpools 132-143 die internen 16S RNS Kontrollen, bei der sich ein 97 bp großes Fragment ergibt. Bis auf einen Zeckenpool (Daten nicht dargestellt) (0,5 % der untersuchten Proben) konnte in der 16S RNS Kontroll RT-PCR in allen RNS-Isolaten eine 97 bp Bande dargestellt werden.

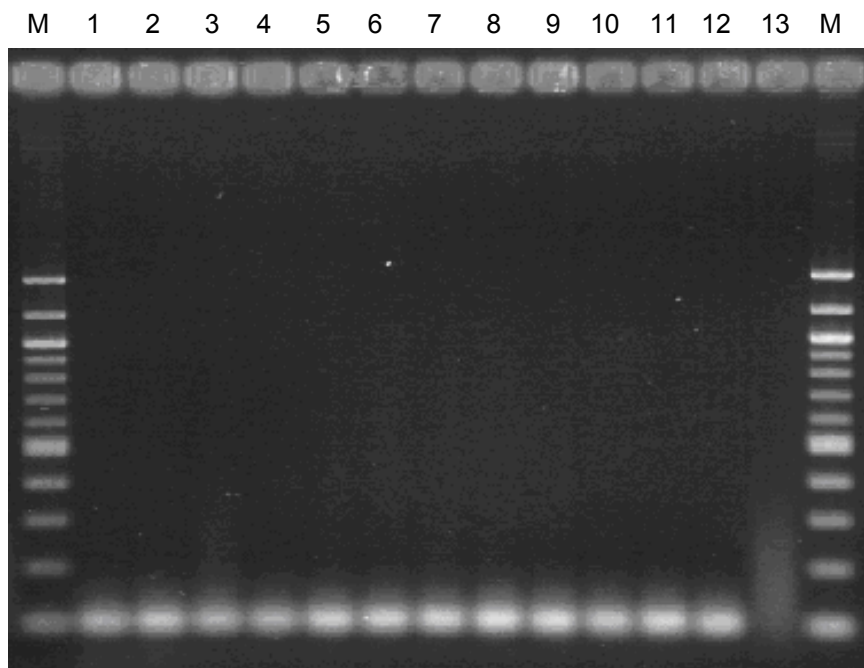


Abb. 23: Beispiel eines Ergebnisses der 16S RNS Zecken RT-PCR, die PCR resultiert in einem etwa 100 bp großen Fragment. 2,3 %iges Agarosegel (M = 100 bp Marker; Spuren 1-12= Zeckenpools aus München bzw. Fürstenfeldbruck (Pool 132- 143); Spuren 13= Negativkontrolle).

4.2.5. Ergebnis der PCR Untersuchungen an Mäusen auf FSMEV

In keiner der 300 untersuchten Milzen konnte FSMEV nachgewiesen werden. Ebenso war es mittels der Hüll-Gen RT-PCR nicht möglich FSMEV in den untersuchten Maushirnen zu detektieren. Exemplarisch ist in Abb. 24 die Untersuchung der Milzproben 608- 631 auf FSMEV-spezifische Nukleinsäuren dargestellt. In Tabelle 16 sind Art und Herkunft der auf FSMEV untersuchten Wildmäuse und die Untersuchungsergebnisse dargestellt.

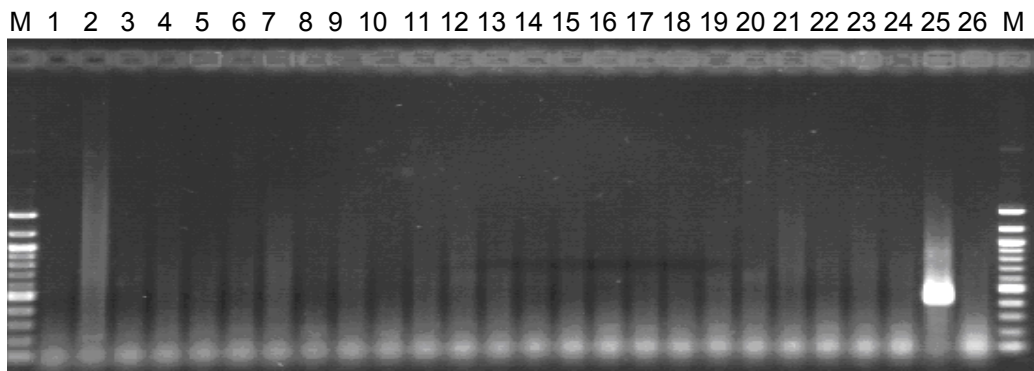


Abb. 24: Exemplarische Darstellung des Probenscreenings der Milzen auf FSMEV. 1,5 %iges Agarosegel, (M= 100 bp Marker, Spuren 1-24= Milzproben 608- 631, 25= Positivkontrolle Langat-Virus 10⁰, 26= Negativkontrolle).

Tab. 16: Darstellung der Ergebnisse des Probenscreenings der Milz- und Hirnproben auf FSMEV-spezifische Nukleinsäuren.

Fangort	Art	negativ	positiv	Gesamt
Erlangen	Gelbhalsmaus	65	0	65
	Rötelmaus	66	0	66
	Sonstige	9	0	9
	Gesamt	140	0	140
Grafrath	Gelbhalsmaus	48	0	48
	Rötelmaus	66	0	66
	Feldmaus	4	0	4
	sonstige	6	0	6
	Gesamt	124	0	124
Traunstein	Gelbhalsmaus	10	0	10
	Rötelmaus	53	0	53
	Feldmaus	15	0	15
	sonstige	1	0	1
	Gesamt	79	0	79
Sonstige Fangorte	Gelbhalsmaus	8	0	8
	Waldmaus	2	0	2
	sonstige	6	0	6
	Gesamt	16	0	16
Gesamt		359	0	359

4.2.5.1. Interne Kontrolle der aus Mäusen isolierten RNS

Auch hier wurden, um die Qualität der RNS zu überprüfen und das negative Ergebnis zu verifizieren, eine interne Kontrolle durchgeführt. Wiederum erfolgte zunächst die Etablierung und Optimierung der PCR (ohne Abbildung).

Alle mit der E-Gen spezifischen RT-nested-PCR untersuchten Organproben, wurden parallel mit der internen Kontroll-PCR auf ihre Qualität hin untersucht. Bei 9 von 300 getesteten Proben (3 %) konnte- auch nach mehrmaliger Wiederholung der PCR- keine Bande dargestellt werden. Bei den übrigen Proben verlief die Interne Kontroll-PCR, die das Cytochrom B als Zielgen hat positiv. In Abb. 25 sind exemplarisch Proben in der Internen Kontroll-PCR dargestellt.

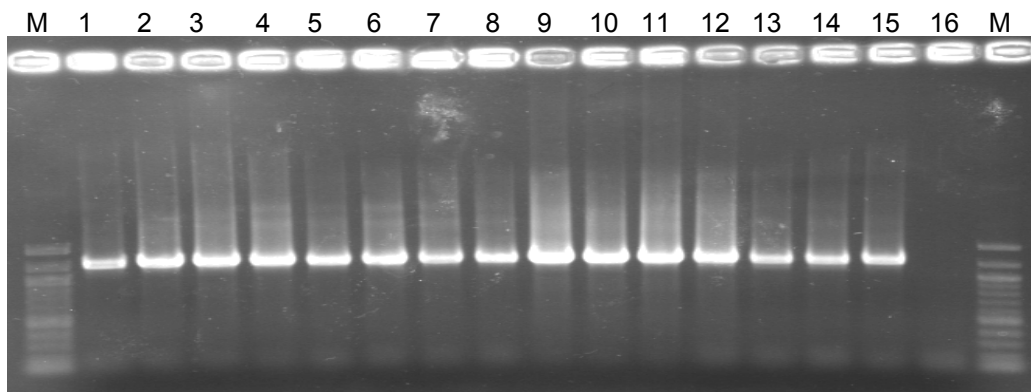


Abb. 25: Beispiel eines Ergebnisses der Cytochrom b-Gen mRNA RT-PCR bei Rötel- und Feldmausproben; die PCR resultiert in einem etwa 1142 bp großen Fragment. 1 %iges Agarosegel, (M= 100 bp Marker; Spuren 1-15= RNS Proben Milz, Spur 16= Negativkontrolle).

4.3. Ergebnisse der Untersuchungen im Zusammenhang mit Borrelien

4.3.1. Etablierung und Optimierung der OspA-Gen spezifischen nested PCR

Um die optimalen Konditionen für die neu entwickelte nested PCR zu ermitteln wurden verschiedene PCR-Ansätze getestet. In Abb. 26 ist exemplarisch ein PCR Ansatz dargestellt, in dem verschiedene $MgCl_2$ -Konzentrationen ausgetestet wurden.

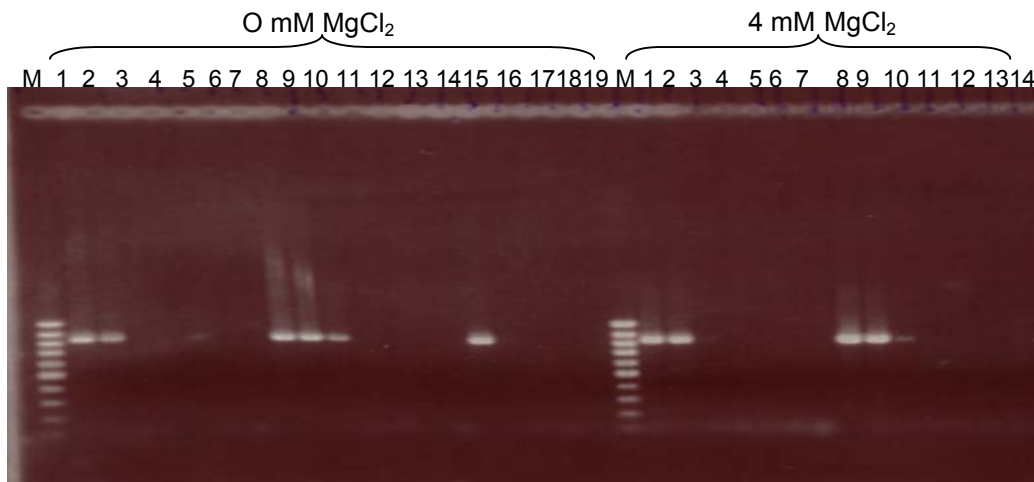


Abb. 26: Etablierung der OspA Gen spezifischen nested PCR, 1,5 %iges Gel. M= 100 bp Marker, Spuren 1- 7= Verdünnungen 10^0 - 10^{-6} von *B. burgdorferi* s.s., Spuren 8- 14= Verdünnungen 10^0 - 10^{-6} von *B. garinii*, Spuren 15- 18= Verdünnungen 10^0 - 10^{-3} von *B. afzelii*, 19= Negativkontrolle).

4.3.2. Sensitivität und Spezifität des Borrelien-spezifischen Nachweisverfahrens

Auch hier wurde, zur Erhöhung der Nachweisgrenze der PCR, mit einem Touchdown Schritt beim Annealing gearbeitet. Nach Ermittlung der optimalen Konditionen konnte eine Nachweisgrenze von 64 DNS Molekülen pro PCR-Ansatz erreicht werden.

Da die etablierte PCR möglichst unterschiedliche Borrelien-Stämme detektieren sollte, wurden mit den ermittelten Konditionen verschiedene Borrelien-Stämme in die PCR eingesetzt. Alle getesteten Stämme (unterschiedliche OspA Genotypen), wurden von der PCR erfasst (Abb. 27). Da viele Wildmäuse auch *Leptospira ssp.* beherbergen können, erschien es wichtig, dass die entwickelte PCR Leptospiren DNS nicht amplifiziert. Die vom Landesuntersuchungsamt in Oberschleißheim zu Verfügung gestellte Probe des Leptospirenstammes *L. patoc* wurde von der PCR nicht erfasst, d.h. die PCR ist Borrelien-spezifisch (Abb. 27).

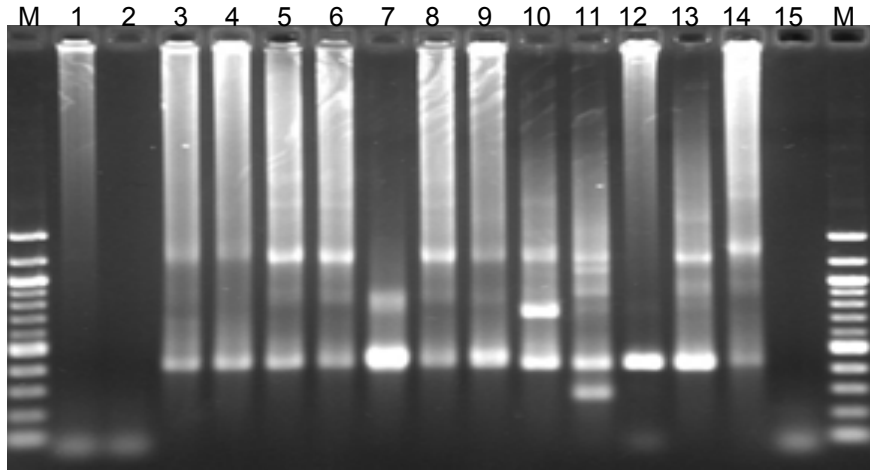


Abb. 27: Bestimmung der Spezifität der OspA-Gen spezifischen PCR, 1,5 %iges Agarosegel. (M= 100 bp Marker; Spuren 1, 2= *L. patoc*; Spuren 3- 6= *B. garinii*, OspA Typen 6,3,5,4; Spur 7= *B. afzelii*, OspA Typ 2; Spuren 8-10= *B. garinii*, OspA Typen 4, 7; Spur 11= *B. valaisiana*; Spur 12= *B. lusitaniae*; Spur 13= *B. burgdorferi*, OspA Typ 1; Spur 14= Positivkontrolle *Borrelia burgdorferi* s.s.; Spur 15= Negativkontrolle).

Wiederum sollte die Inhibition der Borrelien-spezifischen nested PCR ausgeschlossen werden. In diesem Falle wurde Ohrmaterial mit Verdünnungen von 10^{-2} - 10^{-5} , der für diese PCR verwendeten Positivkontrolle, gespikt und in die PCR eingesetzt. Die Nachweisgrenze wurde auch hier wieder erreicht (Abb. 28).

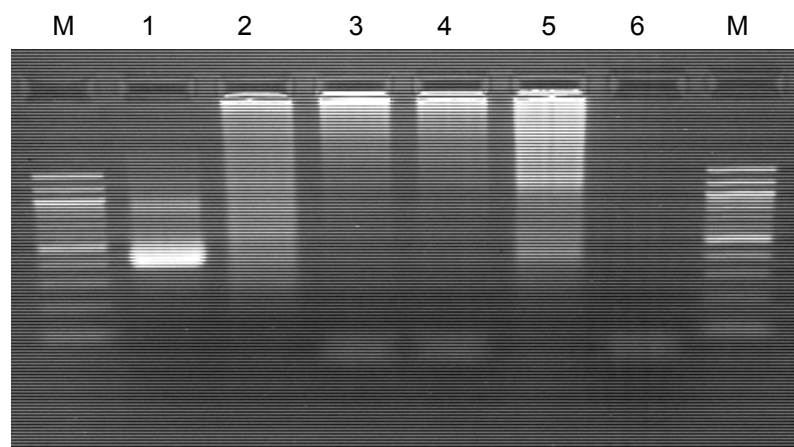


Abb. 28: Nachweisgrenze der Borrelien-spezifischen nested PCR bei gespikten Ohren von Balb-c Mäusen. 1,5 %iges Gel, (M= 100 bp Marker; Spuren 1- 4= Verdünnungen von *Borrelia burgdorferi* s. s. 10^{-2} – 10^{-5} , Spur 5= Positivkontrolle *B. burgdorferi* s.s., Spur 6= Negativkontrolle).

4.3.3. Ergebnis der Untersuchung der Mäuse auf Borrelien-spezifische Nukleinsäure

Bei insgesamt 836 untersuchten Wildmäusen konnten in 91 Tieren Borrelien-spezifische Nukleinsäuren nachgewiesen werden (Tab. 17).

Tab. 17: Darstellung der Ergebnisse des Probenscreenings auf Borrelien-spezifische Nukleinsäuren.

Fangort	Spezies	negativ	positiv	Gesamt
Erlangen	Feldmaus	1	0	1
	Gelbhalsmaus	39	18	57
	Rötelmaus	45	11	56
	Sonstige	8	0	8
	Gesamt	93	29	122
Grafrath	Erdmaus	1	0	1
	Feldmaus	55	4	59
	Gelbhalsmaus	250	17	267
	Rötelmaus	222	11	233
	Schermaus	2	0	2
	Waldmaus	41	2	43
	sonstige	1	0	1
Gesamt	572	34	606	
Traunstein	Erdmaus	1	0	1
	Feldmaus	13	2	15
	Gelbhalsmaus	6	2	8
	Rötelmaus	24	19	43
	Gesamt	44	23	67
Freising	Erdmaus	1	0	1
	Gelbhalsmaus	5	1	6
	Rötelmaus	5	3	8
	Gesamt	11	4	15
Raitenhaslach	Gelbhalsmaus	0	1	1
	Gesamt	0	1	1
Sonstige Fangorte	Feldmaus	1	0	1
	Gelbhalsmaus	9	0	9
	Rötelmaus	4	0	4
	Waldmaus	11	0	11
	Gesamt	25	0	25
Gesamt		745	91	836

Hieraus ergibt sich eine Gesamtprävalenz von allen Fangorten und allen untersuchten Mäusen von 11 %. Im Folgenden werden aus statistischen Gründen nur die Fangorte Erlangen, Traunstein und Grafrath und die Mausarten Gelbhals- und Rötelmaus betrachtet.

4.3.3.1. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der Art

Insgesamt konnten in den Fangorten Erlangen, Grafrath und Traunstein 347 Gelbhals- und 344 Rötelmäuse gefangen werden. Die Anzahl der jeweils positiv und negativ getesteten Tiere und die ermittelte Prävalenz, die sich für die jeweilige Mausspezies ergibt, ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten Gelbhals- und Rötelmäuse.

Spezies	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
Gelbhalsmaus	309	38	347	11 %
Rötelmaus	300	44	344	13 %
Gesamt	609	82	691	12 %

Es stellte sich die Frage, ob es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der Borrelien-Infektionen bezüglich der Mausspezies gibt. Zu diesem Zweck, wurde der Chi-Quadrat Test nach Pearson durchgeführt ($X^2 = 0,559$). Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Borrelien-Infektionen bezüglich der Art ($p = 0,482$).

4.3.3.2. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Fangort

Da die Art als prädestinierender Faktor ausgeschlossen werden konnte, werden hier Gelbhals- und Rötelmäuse für die drei Fangorte Erlangen, Grafrath und Traunstein gemeinsam betrachtet. Die Anzahl der in drei Orten gefangenen negativen und positiven Tiere sowie die ermittelte Prävalenz für die einzelnen Fangorte ist in Tabelle 19 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 19: Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten Gelbhals- und Rötelmäuse in den Fangorten Erlangen, Grafrath und Traunstein sowie die ermittelte Prävalenz für die einzelnen Fangorte.

Fangort	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
Grafrath	572	34	606	6 %
Erlangen	89	29	118	25 %
Traunstein	44	23	67	34 %
Gesamt	705	86	791	11 %

Zur Klärung der Frage, ob sich die genannten Fangorte in der Häufigkeit der auftretenden Borrelien-Infektionen unterscheiden, wurde ein Chi-Quadrat Test nach Pearson durchgeführt ($\chi^2 = 78,223$). Dabei ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den genannten Fangorten ($p = < 0,0001$).

4.3.3.3. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Geschlecht

In den Fanggebieten Erlangen, Grafrath und Traunstein konnten insgesamt 691 Gelbhals- und Rötelmäuse gefangen werden. Bei 49 Tieren war eine Geschlechtsdetermination aufgrund juveniler Stadien nicht möglich. Für die restliche Tiere konnte Folgendes festgestellt werden: Von den 642 Gelbhals- und Rötelmäusen waren 335 Tiere männlich und 307 Tiere weiblich. Die Anzahl der negativ und positiv getesteten männlichen und weiblichen Mäuse sowie die für das jeweilige Geschlecht ermittelte Prävalenz ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tab. 20: Anzahl der Borrelien negativ beziehungsweise positiv getesteten weiblichen und männlichen Gelbhals- und Rötelmäuse sowie die für das entsprechende Geschlecht ermittelte Prävalenz.

Geschlecht	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
männlich	289	46	335	14 %
weiblich	276	31	307	10 %
Gesamt	565	77	642	12 %

Auch hier stellte sich die Frage, ob es einen Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von Borrelien-Infektionen zwischen männlichen und weiblichen Mäusen gibt. Wiederum wurde der Chi-Quadrat Test nach Pearson angewendet ($\chi^2 = 2,0044$). Dabei ergibt sich zwar ein tendenzieller Unterschied in der Borrelien-Befallshäufigkeit zwischen männlichen und weiblichen Gelbhals- und Rötelmäusen, der jedoch nach Chi-Quadrat nicht signifikant ist ($p = 0,157$). Der Faktor Geschlecht spielt somit keine Rolle für die Befallshäufigkeit.

4.3.3.3.1. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Trächtigkeitszustand

Von den 307 gefangenen weiblichen Gelbhals- und Rötelmäusen waren 62 Tiere trächtig. Die Anzahl der negativ und positiven Mäuse unter Beachtung des Trächtigkeitszustandes ist in Tabelle 21 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 21: Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten trächtigen/ nicht trächtigen weiblichen Gelbhals- und Rötelmäuse sowie die ermittelte Prävalenz.

Trächtigkeitszustand	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
nicht trächtig	221	24	245	10 %
trächtig	53	9	62	15 %
Gesamt	274	33	307	11 %

Es konnte für nicht trächtige Gelbhals- und Rötelmäuse eine Prävalenz von 10 % und für trächtige Tiere eine Prävalenz von 15 % ermittelt werden. Es sollte geklärt werden, ob der Trächtigkeitszustand die Borrelien-Befallshäufigkeit beeinflusst. Im durchgeführten Chi-Quadrat Test nach Pearson ($\chi^2 = 1,393$) ergab sich bezüglich des Borrelien-Befalls kein signifikanter Unterschied zwischen nicht trächtigen und trächtigen Tieren ($p = 0,238$).

4.3.3.3.2. Borrelien-Infektion bei männlichen Tieren in Abhängigkeit vom Gonadengewicht

Für die männlichen Gelbhals- und Rötelmäuse sollte untersucht werden, ob ein geschlechtsspezifischer Parameter, wie z. B. das Gonadengewicht (gemessen in Gramm), Einfluß auf die Häufigkeit des Borrelien-Befalls nimmt. Die beiden genannten Mausarten wurden in diesem Fall getrennt voneinander betrachtet. Dabei wurden 172 männliche Gelbhalsmäuse und 178 männliche Rötelmäuse untersucht. Von den männlichen Gelbhalsmäusen waren 151 Tiere negativ (Mittelwert= 0,67 g; Standardabweichung= 1,00 g) und 21 Tiere Borrelien positiv (Mittelwert= 0,97 g; Standardabweichung= 0,69 g). Bei den Rötelmäusen waren 151 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 0,70 g; Standardabweichung= 0,54 g) und 27 Tiere positiv (Mittelwert= 1,04 g; Standardabweichung= 0,43 g).

Im Box plot erschienen Männchen mit höherem Gonadengewicht häufiger mit Borrelien infiziert zu sein, als Männchen mit niedrigerem Gonadengewicht (Abb. 29). Nach ermittelter Varianzhomologie (Levene-Test) der beiden Stichproben, wurde für beide Mausarten der T-Test bei Varianzgleichheit durchgeführt.

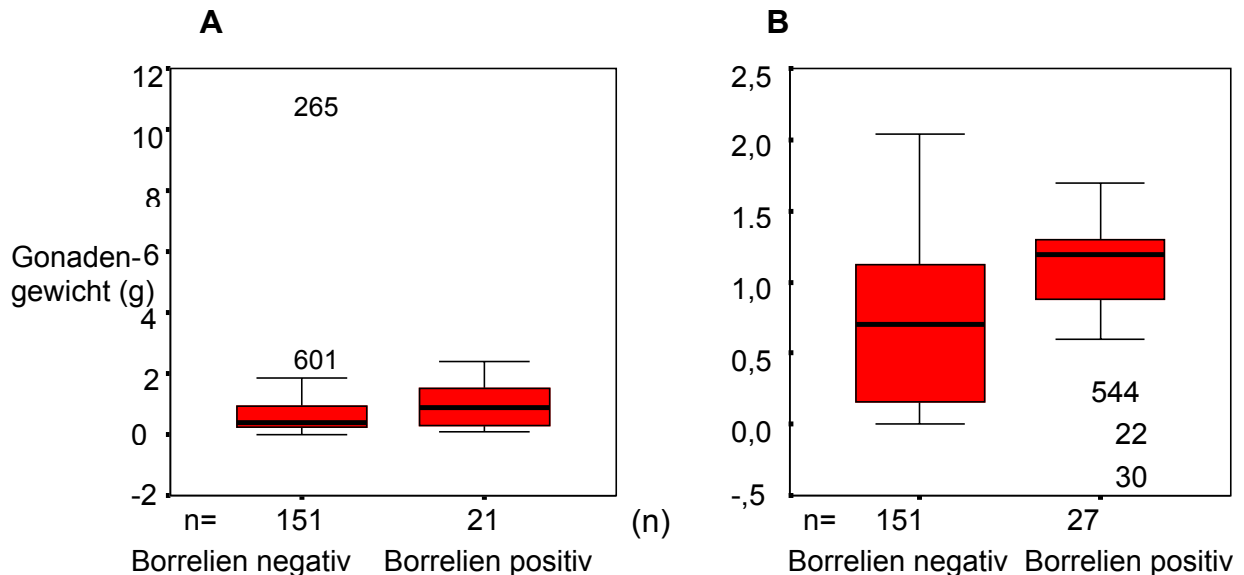


Abb. 29: Abhängigkeit des Gonadengewicht (in Gramm) zur Häufigkeit der Borrelien-Infektion bei männlichen A: Gelbhalsmäusen, B: Rötelmäusen (dargestellt im Box plot; schwarze horizontale Linie entspricht 50 %).

Für die Gelbhalsmausmännchen ergab sich im T-Test kein signifikanter Unterschied in der Befallshäufigkeit zwischen Tieren mit niedrigen bzw. hohem Gonadengewicht ($p = 0,190$). Im Gegensatz dazu ergab der für die männlichen Rötelmäuse durchgeführte T-Test einen signifikanten Unterschied, bezüglich des Borrelien-Befalls, zwischen Tieren mit niedrigen und Tieren mit hohem Gonadengewicht ($p = 0,003$). Somit waren signifikant mehr Rötelmausmännchen mit höherem Gonadengewicht mit Borrelien infiziert, als Rötelmausmännchen mit niedrigerem Gonadengewicht.

4.3.3.4. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Gewicht

Hier wurden Gelbhals- und Rötelmäuse sowie die Geschlechter getrennt voneinander betrachtet. Von 347 gefangenen Gelbhalsmäusen, wurden 173 männliche und 162 weibliche Tiere miteinbezogen. Bei 344 gefangenen Rötelmäusen, wurden 179 männliche und 154 weibliche Tiere berücksichtigt.

Es stellte sich die Frage, ob das Gewicht der Tiere einen Einfluß auf die Häufigkeit der Borrelien-Infektionen nehmen würde. In den angefertigten Box plots erschien das Gewicht der Borrelien positiven Mäuse im Mittel höher als das der Borrelien negativen Mäuse (Abb. 30).

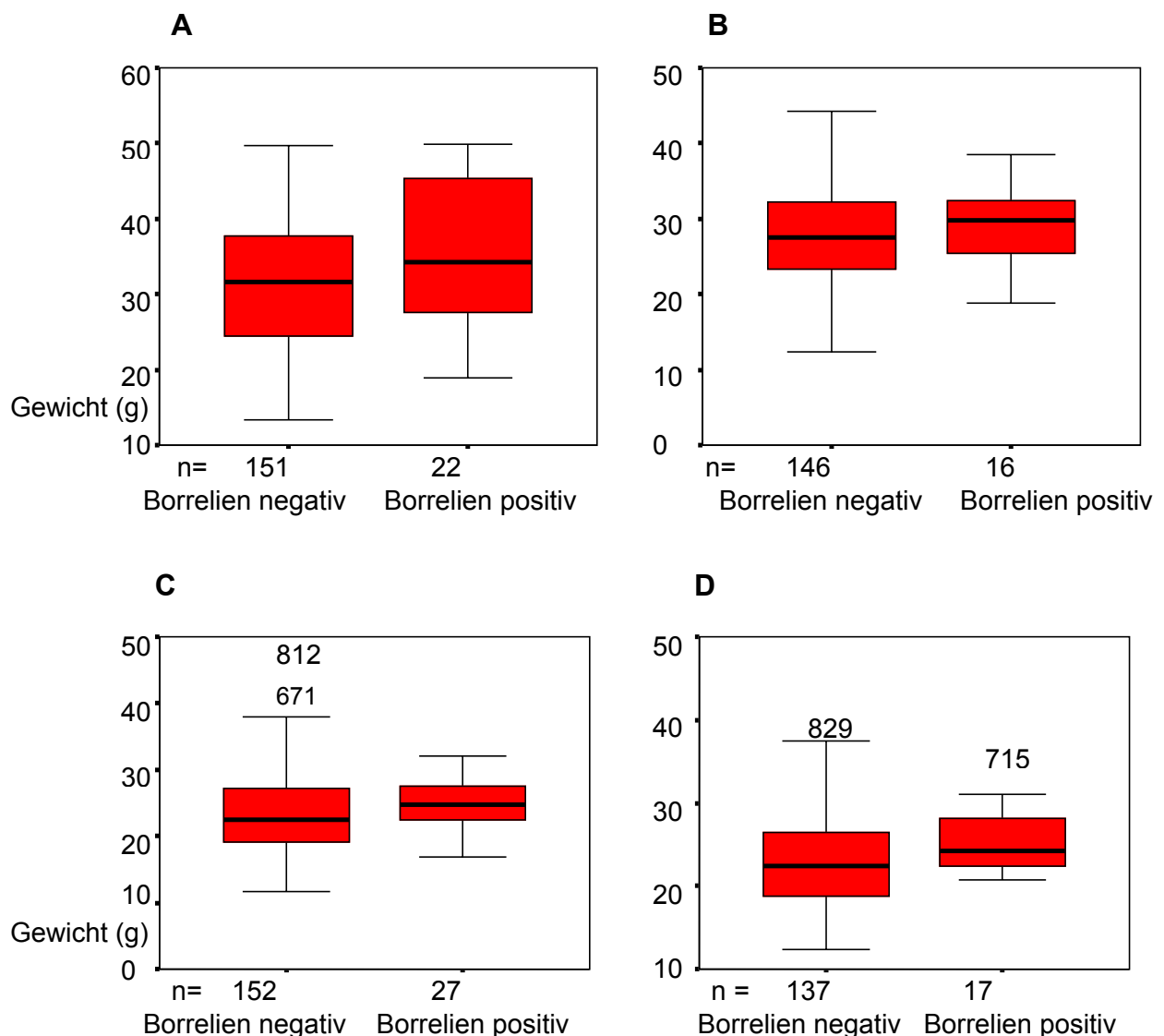


Abb. 30: Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und Gewicht bei A: männlichen Gelbhalsmäusen, B: weiblichen Gelbhalsmäusen, C: männlichen Rötelmäusen und D: weiblichen Rötelmäusen (dargestellt im Box plot).

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst für alle Gruppen die Varianzgleichheit untersucht (Levene Test), um anschließend den T-Test durchzuführen. Von den 173 untersuchten männliche Gelbhalsmäuse waren 151 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 31,37 g; Standardabweichung= 8,25 g) und 22 Tiere positiv (Mittelwert= 34,82 g; Standardabweichung= 9,16 g). Mittels T-Test konnte gezeigt werden, dass die Borrelien positiven Gelbhalsmausmännchen im Mittel schwerer waren, als die Borrelien negativen Gelbhalsmausmännchen. Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0365$).

Bei den weiblichen Gelbhalsmäusen konnte kein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen Borrelien positiven und Borrelien negativen Tieren ermittelt werden. Es wurden 162 weibliche Gelbhalsmäuse ausgewertet. Davon erwiesen sich 146 Tiere als negativ (Mittelwert= 28,08 g; Standardabweichung= 6,89 g) und 16 als positiv (Mittelwert= 29,25 g; Standardabweichung= 5,52 g). Obgleich auch bei dieser Gruppe im Box plot der Eindruck entsteht, dass Borrelien positive Tiere im Mittel schwerer sind, ergab sich im T-Test für Mittelwertgleichheit kein signifikanter Unterschied ($p= 0,255$).

Von den 179 untersuchten männlichen Rötelmäuse erwiesen sich 152 als Borrelien negativ (Mittelwert= 23,38 g; Standardabweichung= 5,70 g) und 27 als positiv (Mittelwert= 24,95 g; Standardabweichung= 3,70 g). Die Varianzgleichheit konnte hier nicht bestätigt werden (Levene). Unter Berücksichtigung dessen wurde der T-Test durchgeführt. Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen positiv und negativ getesteten Rötelmausmännchen bezüglich ihres Gewichts ($p= 0,0345$).

Bei 154 getesteten weiblichen Rötelmäusen, waren 137 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 23,13 g; Standardabweichung= 5,47 g) und 17 Tiere positiv (Mittelwert= 25,65 g; Standardabweichung= 4,90 g). Im T-Test für Mittelwertgleichheit wurde ein signifikanter Gewichtsunterschied zwischen Borrelien negativen und positiven Tieren festgestellt ($p= 0,0351$).

Im Mittel waren Borrelien positiv getestete männliche Gelbhals- und Rötelmäuse sowie weibliche Rötelmäusen schwerer, als negativ getestete Mäuse. Für weibliche Gelbhalsmäuse konnte dies nicht bestätigt werden.

4.3.3.5. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der Kopf-Rumpf-Länge (KR-Länge)

Für diese Untersuchung wurden Gelbhals- und Rötelmäuse sowie männliche und weibliche Tiere getrennt voneinander betrachtet. Von den 347 gefangenen Gelbhalsmäusen konnten hier 173 männliche Mäuse und 163 weibliche Mäuse miteinbezogen werden. Bei 344 gefangenen Rötelmäusen wurden bei dieser Untersuchung 179 Männchen und 153 Weibchen berücksichtigt. Es ergab sich die Frage, ob der Faktor Kopf-Rumpf-Länge einen Einfluß auf die Befallshäufigkeit mit Borrelien hat. In den angefertigten Box plots erschien die KR-Länge der Borrelien positiven Tiere im Mittel höher zu liegen, als die der Negativen (Abb. 31).

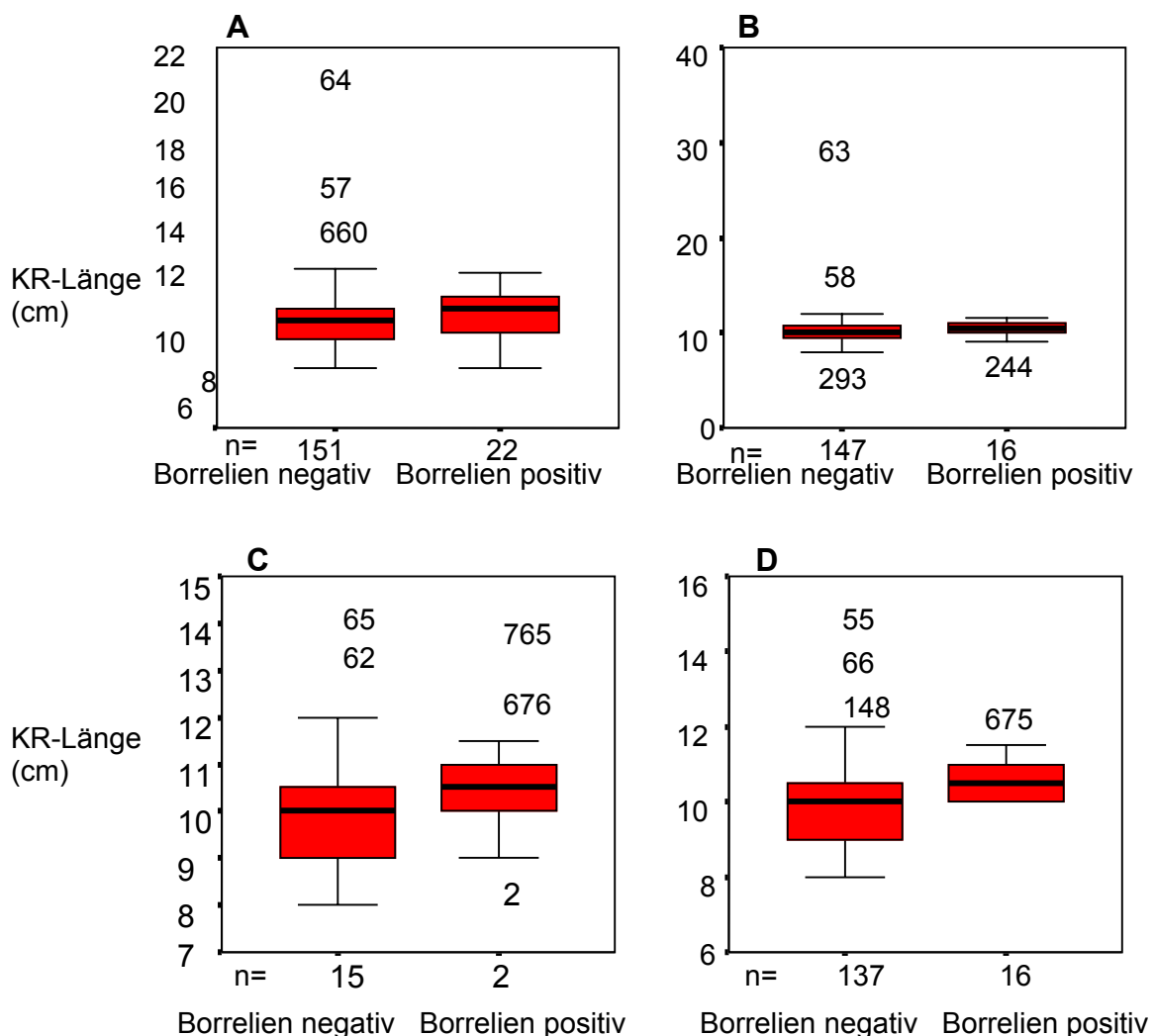


Abb. 31: Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und Kopf-Rumpf-Länge bei A: männlichen Gelbhalsmäusen, B: weiblichen Gelbhalsmäusen, C: männlichen Rötelmäusen und D: weiblichen Rötelmäusen (dargestellt im Box plot).

Für alle Gruppen konnte Varianzgleichheit festgestellt werden (Levene). Bei 151 männlichen Gelbhalsmäusen konnten keine Borrelien-spezifischen Amplifikate nachgewiesen werden (Mittelwert= 10,59 cm; Standardabweichung= 1,69 cm). 22 Tiere waren Borrelien positiv (Mittelwert= 10,81 cm; Standardabweichung= 1,04 cm). Im T-Test wurde kein signifikanter Unterschied in der Borrelien-Befallshäufigkeit zwischen kleineren und größeren Tieren ermittelt ($p= 0,551$).

In 163 untersuchten Gelbhalsmausweibchen waren 147 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 10,16 cm; Standardabweichung= 1,97 cm) und 16 Tiere positiv (Mittelwert= 10,34 cm; Standardabweichung= 1,06 cm). Auch hier konnte mittels des T-Tests kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ($p= 0,721$).

Von 179 männlichen Rötelmäusen erwiesen sich 152 Mäuse als Borrelien negativ (Mittelwert= 9,86 cm; Standardabweichung= 0,99 cm) und 27 Mäuse als positiv (Mittelwert= 10,55 cm; Standardabweichung= 1,08 cm). Im durchgeführten T-Test ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Borrelien Befallshäufigkeit zwischen Tieren mit geringerer KR-Länge und Tieren mit großer KR-Länge ($p= 0,001$).

Bei 153 Rötelmausweibchen waren 137 Mäuse negativ (Mittelwert= 10,01 cm; Standardabweichung= 1,10 cm). In 16 Mäusen wurden spezifische Amplifikate detektiert (Mittelwert= 10,62 cm; Standardabweichung= 0,67 cm). Auch für diese Gruppe konnte im T-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren festgestellt werden ($p= 0,033$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit dem T-Test für die Kopf-Rumpf-Länge bei Gelbhalsmäusen kein Unterschied in der Befallshäufigkeit zwischen Tieren mit kleiner KR-Länge und Tieren mit großer KR-Länge ermittelt werden konnte. Jedoch nimmt die KR-Länge, laut den im T-Test ermittelten Daten, Einfluß auf die Borrelien-Befallshäufigkeit in Rötelmäusen beiderlei Geschlechts.

4.3.3.6. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom *Body mass index* (BMI)

Der BMI der Tiere wurde mit der Formel: Gewicht der Tiere in Gramm / (KR-Länge in mm)² berechnet. Auch hier wurden männliche und weibliche Mäuse sowie die Mausarten Gelbhals- und Rötelmaus getrennt betrachtet. Von 347 gefangenen Gelbhalsmäusen wurden hier 173 männliche Mäuse und 163 weibliche Mäuse miteinbezogen. Bei 344 gefangenen Rötelmäusen wurden bei dieser Untersuchung 179 Männchen und 153 Weibchen berücksichtigt. Es ergab sich die Frage, ob der BMI einen Einfluß auf die Befallshäufigkeit mit Borrelien hat. In den angefertigten Box plots erschien der BMI Borrelien positiven männlicher Gelbhalsmäuse im Mittel höher zu liegen, als das der negativen Mäuse. Bei den Rötelmäusen und den weiblichen Gelbhalsmäusen erschien der BMI der Borrelien positiven Mäuse im Mittel eher geringer zu sein (Abb. 32).

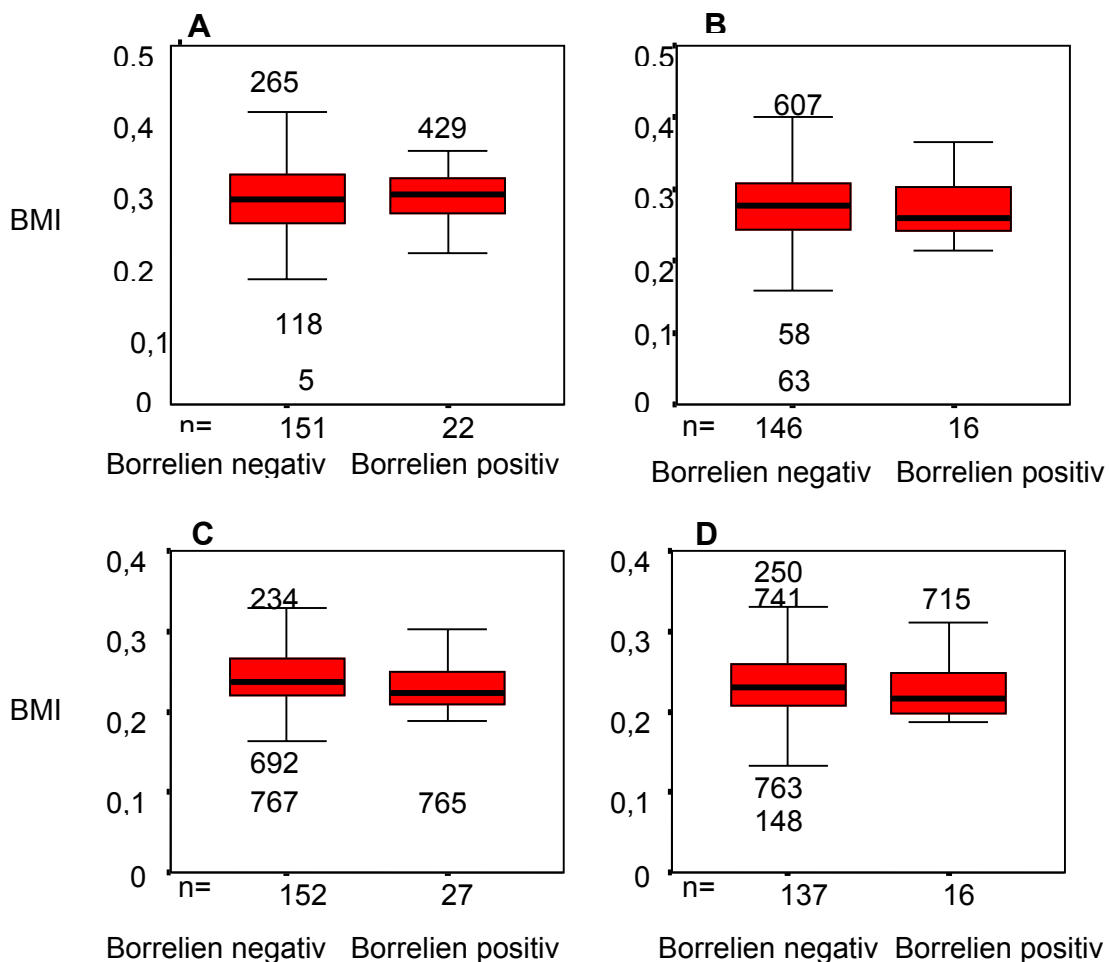


Abb. 32: Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und BMI bei A: männlichen Gelbhalsmäusen, B: weiblichen Gelbhalsmäusen, C: männlichen Rötelmäusen und D: weiblichen Rötelmäusen (dargestellt im Box plot).

Wiederum wurde für die vier Gruppen die Varianzgleichheit bestimmt (Levene).

151 der hier miteinbezogenen Gelbhalsmausmännchen waren Borrelien negativ (Mittelwert= 0,28; Standardabweichung= 0,059). 22 Männchen waren Borrelien positiv (Mittelwert= 0,29; Standardabweichung= 0,04). Im anschließend durchgeführten T-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Mäusen festgestellt ($p= 0,46$).

Bei den weiblichen Gelbhalsmäusen erwiesen sich 146 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 0,27; Standardabweichung= 0,05) und 16 Tiere als positiv (Mittelwert= 0,27; Standardabweichung= 0,42). Auch hier konnte im T-Test kein signifikanter Unterschied in der Befallshäufigkeit zwischen Mäusen mit niedrigem und Mäusen mit hohem *Body mass index* ermittelt werden ($p= 0,84$).

Bei den männlichen Rötelmäusen konnten in 27 Tieren Borrelien-spezifische Amplifikate gefunden werden (Mittelwert= 0,24; Standardabweichung= 0,04). Die übrigen 152 Tiere waren negativ (Mittelwert= 0,22; Standardabweichung= 0,03). Bei den weiblichen Rötelmäusen waren 137 Tiere Borrelien negativ (Mittelwert= 0,24; Standardabweichung= 0,04) und 27 Tiere positiv (Mittelwert= 0,22; Standardabweichung= 0,03). Weder für männliche ($p= 0,148$) noch für weibliche ($p= 0,935$) Rötelmäuse konnte im T-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren ermittelt werden.

Zusammenfassend ist feststellbar, dass mittels des hier verwendeten Tests kein signifikanter Einfluß des *Body mass index* auf die Borrelien-Befallshäufigkeit nachweisbar ist.

4.3.3.7. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit des Parasitenbefalls

4.3.3.7.1. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Zeckenbefall

Im Folgenden werden Gelbhals- und Rötelmäuse wieder in einer Gruppe zusammengefasst. Von den hier miteinbezogenen 691 Wildmäusen waren 264 Mäuse mit Zecken befallen (Abb. 33).

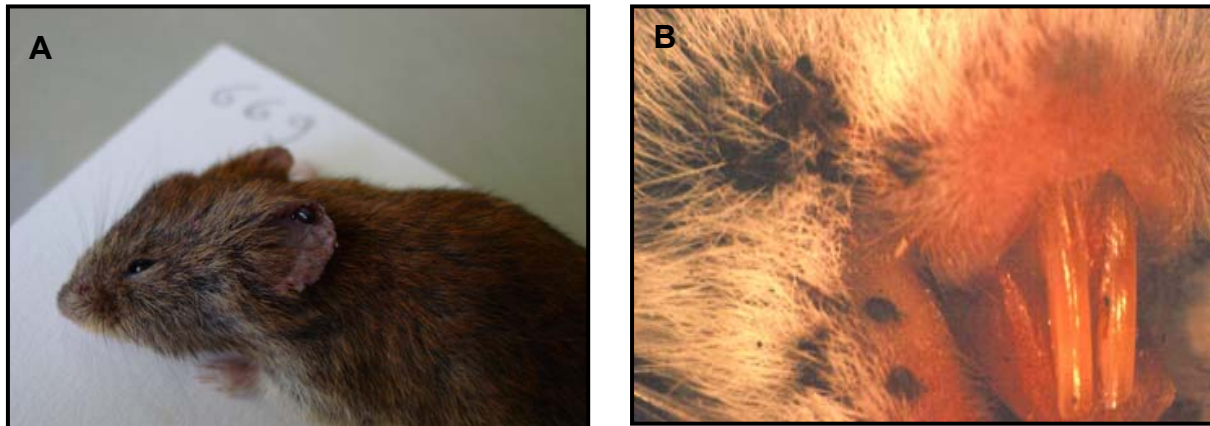


Abb. 33: Exemplarische Darstellung zweier Mäuse mit Zeckenbefall A: Rötelmaus mit Zecke in Ohrmuschel, B: Gelbhalsmaus mit hochgradigem Zeckenbefall im Gesichtsbereich.

In Tabelle 22 ist die Anzahl der Borrelien positiven und Borrelien negativen Mäuse mit beziehungsweise ohne Zeckenbefall zusammenfassend dargestellt.

Tab 22: Anzahl der mit Zecken befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.

Zeckenbefall	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
nein	396	31	427	7 %
ja	213	51	264	19 %
Gesamt	609	82	691	12 %

Aufgrund des großen Borrelien Prävalenzunterschieds zwischen Mäusen ohne Zeckenbefall und Mäusen mit Zeckenbefall, sollte dies auch statistisch überprüft werden.

Im Chi-Quadrat Test nach Pearson ($X^2= 22,68$) ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Borrelien-Befallshäufigkeit zwischen Mäusen ohne Zeckenbefall

und Mäusen mit Zeckenbefall ($p = < 0,0001$). Tiere mit Zecken waren also deutlich häufiger mit Borrelien befallen.

4.3.3.7.2. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Flohbefall

Von den untersuchten 691 Tieren waren 127 mit Flöhen befallen. Die Anzahl der Borrelien negativen und positiven Tiere ist in Tabelle 23 wiedergegeben.

Tab 23: Anzahl der mit Flöhen befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.

Flohbefall	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
nein	508	56	564	10 %
ja	101	26	127	20 %
Gesamt	609	82	691	12 %

Auch hier besteht ein großer Prävalenzunterschied zwischen Mäusen bei denen keine Flöhe auffindbar waren und Mäusen mit Flohbefall. Zur statistischen Absicherung, wurde der Chi-Quadrat Test nach Pearson durchgeführt ($X^2 = 11,02$). Dabei ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Borrelien-Befallshäufigkeit. Mäuse mit Flohbefall waren deutlich häufiger Borrelien positiv, als Mäuse ohne Flöhe ($p = 0,001$).

4.3.3.7.3. Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Haarlingsbefall

Von den untersuchten 691 Tieren wurde bei 54 Haarlingsbefall festgestellt. Die Anzahl der Borrelien negativen und positiven Tiere ist in Tabelle 24 wiedergegeben.

Tab. 24: Anzahl der mit Haarlingen befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.

Haarlingsbefall	Borrelien negativ	Borrelien positiv	Gesamt	Prävalenz
nein	572	65	637	10 %
ja	37	17	54	31 %
Gesamt	609	82	691	12 %

Wiederum erfolgte die statistische Abklärung der Signifikanz mittels Chi-Quadrat Test nach Pearson ($X^2= 21,54$). Es konnte ein hochsignifikanter Unterschied ermittelt werden ($p= < 0,0001$). In Mäusen mit Haarlingsbefall konnten somit deutlich häufiger Borrelien-spezifische Amplifikate nachgewiesen werden, als in Mäusen ohne Haarlinge.

4.3.3.8. Borrelien-Infektion in jahreszeitlicher Abhängigkeit

Es konnte eine jahreszeitliche Häufung der Borrelien-Infektionen beobachtet werden, die sich jedoch für die einzelnen Fangorte unterschiedlich darstellt. Dabei schwankte in Erlangen die Borrelien-Prävalenz zwischen 0- 36 % mit Prävalenzpeaks im März und August. In Grafrath konnten Prävalenzunterschiede zwischen 0- 13 % festgestellt werden, wobei sich für die Monate April und Dezember ein Peak erkennen lässt. Für Traunstein ergaben sich Prävalenzen zwischen 12 % und 50 %, wobei in den Monaten Mai und Juni die meisten positiven Mäuse gefangen wurden.

4.4. Molekulare Analysen

4.4.1. Sequenzanalysen

In 91 Borrelien positiven Proben, wurde 74 mal *Borrelia afzelii* gefunden und war somit der am häufigsten vertretene Genotyp. Aus fünf Proben konnte *Borrelia burgdorferi* und aus zwei Proben *Borrelia garinii* isoliert werden. Bei zehn Proben war die Bestimmung des Genotyps nicht möglich. Trotz mehrfache Ansätze konnten bei diesen Proben die Sequenzkurven nicht ausgewertet werden. Bemerkenswert ist, dass in Traunstein ausschließlich *B. afzelii* gefunden wurde. In Tabelle 25 ist die ermittelte Anzahl der verschiedenen Genotypen in den drei Fangorten dargestellt.

Tabelle 25: Anzahl der in den drei Fangorten ermittelten Genotypen von *B. burgdorferi* s.l..

Genotyp	Erlangen	Grafrath	Traunstein	sonstige	Gesamt
<i>B. afzelii</i>	23	26	23	2	74 (81 %)
<i>B. burgdorferi</i>	0	5	0	0	5 (6 %)
<i>B. garinii</i>	1	1	0	0	2 (2%)
unbekannt	5	5	0	0	10 (11 %)
Gesamt	29	37	23	2	91

Die Sequenzhomologien liegen auf Nukeotidebene zwischen 62,7 % und 100 %. Auf Aminosäureebene liegen die Übereinstimmungen der Sequenzen zwischen 41,9 % und 100 % (siehe Tabellen 26 und 27). Ermittelte Sequenzen wurden an die Gendatenbank übermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>) und haben dort Accessionsnummern erhalten.

4.4.2. Stammbaumanalysen

Mittels Maximum Parsimony (bootstrap 100) wurden Stammbäume auf Nukleotid- und Aminosäureebene angefertigt. Für die Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurden doppelt vorliegende Sequenzen nur einfach berücksichtigt. Sequenzen, die für die Phylogenie verwendet wurden sowie doppelt vorliegende Sequenzen sind in Tabelle 30 (Anhang, Kapitel 10.2.) aufgelistet. Tabelle 31 (Anhang, Kapitel 10.2) gibt die verwendeten Referenzstämme wieder. Die mit dem Programm Treeview (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) dargestellten Stammbäume sind in Abbildung 34 und Abbildung 35 gezeigt.

Die kursiv gedruckten Zahlen an den Aufzweigungen geben die *Bootstrap values* wieder, dabei sind nur Werte über 40 dargestellt.

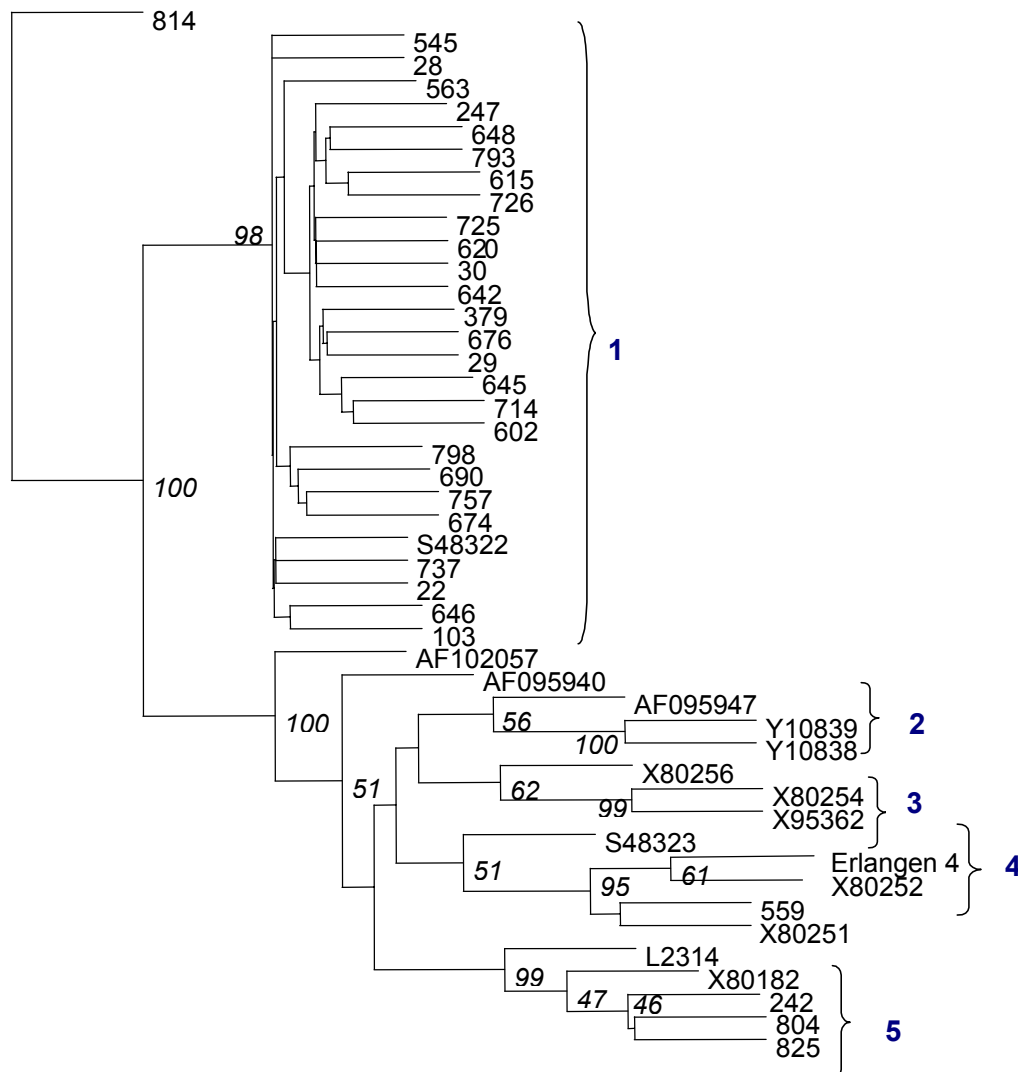


Abb. 34: Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Nukleotidebene (100X bootstrap, max. Parsimonie); Erläuterungen siehe Text.

Der Nukleotid-Stammbaum zeigt dabei fünf Cluster. Die Gruppen sind sehr homogen zusammengesetzt. Cluster 1 wird durch Sequenzen der Spezies *B. afzelii* gebildet, die einen sehr hohen Verwandtschaftsgrad zueinander erkennen lassen. Cluster 2 umfasst sowohl eine Sequenz der Spezies *B. valaisiana* (AF095947), als auch eine Gruppierung der Spezies *B. lusitaniae* (Y10838, Y10839). Cluster 3 wird durch Sequenzen der Borrelienspezies *B. garinii* gebildet (X80256, X95362 und X80254 /OspA-Typen 3, 7). Das vierte Cluster enthält ebenfalls Sequenzen von *B. garinii* und wird durch S48323, X80252, X80251 (OspA-Typen 4, 6, 5) sowie aus Borrelien DNS aus Maus Nummer 559 repräsentiert. Ebenfalls eine homogenen Zusammensetzung hat Cluster 5 mit Vertretern von *B. burgdorferi* s.s. (L23144, X80182 (jeweils OspA-Typ 1) und aus Borrelien DNS aus Maus Nummer 242, 804, 825). Die Sequenzen 814 und AF102057 stehen intermediär.

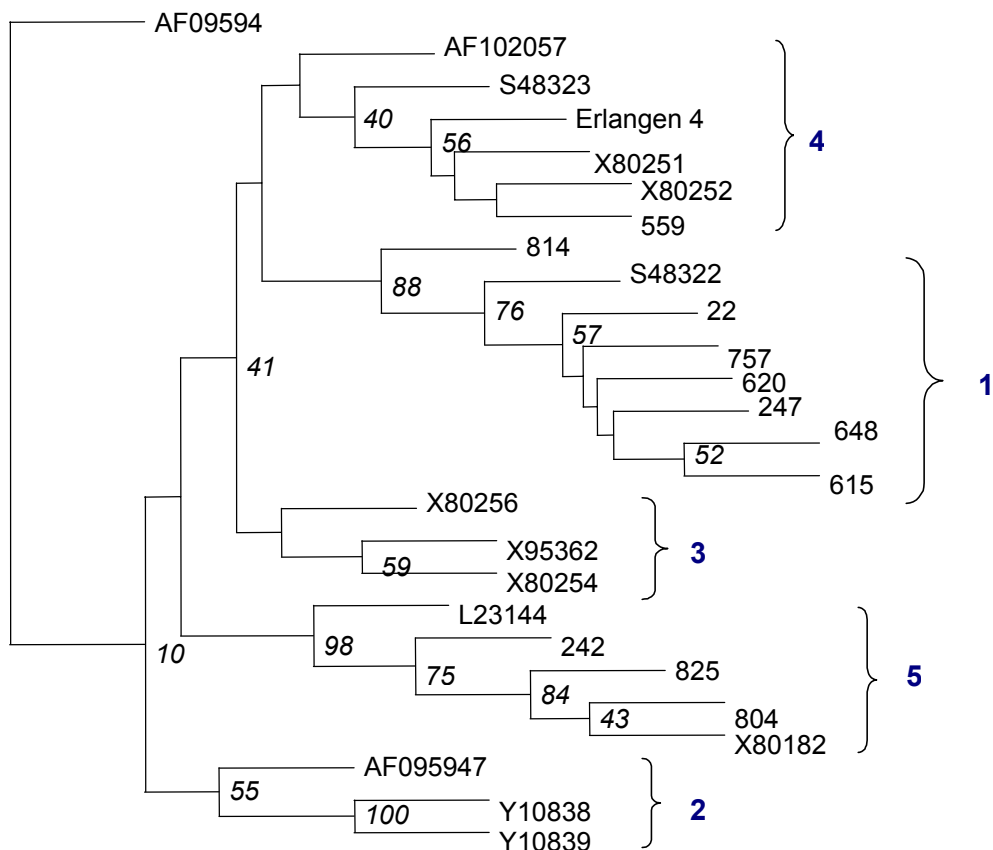


Abb. 35: Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Aminosäureebene (100x bootstrap, max. Parsimonie); Erläuterungen siehe Text.

Für die Erstellung des Aminosäurestammbaumes (Abb. 35) wurden die Sequenzen auf Aminosäureebene zunächst nochmals verglichen. Auch hier wurden Sequenzen, die auf Aminosäureebene identisch waren, nur einfach für die Erstellung des Stammbaumes verwendet. Auf Aminosäureebene kann die Aufteilung in fünf sehr homogene Cluster bestätigt werden. Die Gruppierungen entsprechen den für den Stammbaums auf Nukleotidebene dargestellten Borrelienspezies.

Tabelle 27 zeigt die Sequenzhomologie (Angaben in Prozent), der für die phylogenetischen Analysen verwendeten Sequenzen zueinander. Die Felder oberhalb der Diagonale stellen dabei die Übereinstimmung der Sequenzen auf Nukleotidebene dar. Die Felder unterhalb der Diagonalen beziehen sich auf Übereinstimmungen der Sequenzen auf Aminosäureebene. Tabelle 26 gibt wieder, welche Sequenzen in Tabelle 27 verglichen wurden.

Tab. 26: Erläuterung der in Tabelle 27 verwendeten Zahlen (1-46), die als Platzhalter für den tatsächlichen Sequenznamen eingesetzt wurden.

Platzhalter	Sequenzname	Platzhalter	Sequenzname	Platzhalter	Sequenzname
1 =	22	16 =	645	31 =	825
2 =	28	17 =	646	32 =	Erlangen 4
3 =	29	18 =	648	33 =	AF095940
4 =	30	19 =	674	34 =	AF095947
5 =	103	20 =	676	35 =	AF102057
6 =	242	21 =	690	36 =	L23144
7 =	247	22 =	714	37 =	S48322
8 =	379	23 =	725	38 =	S48323
9 =	545	24 =	726	39 =	X80182
10 =	559	25 =	737	40 =	X80251
11 =	563	26 =	757	41 =	X80252
12 =	602	27 =	793	42 =	X80254
13 =	615	28 =	798	43 =	X80256
14 =	620	29 =	804	44 =	X95362
15 =	642	30 =	814	45 =	Y10838
				46 =	Y10839

5. Diskussion

Zielsetzung der Arbeit war es, die Prävalenz von FSMEV und *Borrelia burgdorferi* in Wildmäusen und Zecken ausgewählter Gebiete Bayerns zu bestimmen. Zudem sollten positive Proben sequenziert und mit daraus gewonnenen Daten phylogenetische Analysen durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden in Erlangen, Traunstein und Grafrath Wildmäuse sowie Zecken in Münchner Parkanlagen, und in Schöngeising im Landkreis Fürstfeldbruck gefangen. Die Untersuchung dieser Tiere auf die beiden Erreger erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion. Im Folgenden werden die Resultate diskutiert.

5.1. Fangorte und Fangergebnisse

5.1.1. Zecken

Die Zeckenfangorte Englischer Garten, Nymphenburger Park, Forstenrieder Park und Schöngeising wurden gewählt, da sie beliebte Erholungsgebiete darstellen (<http://www.muenchen.de>). Die Möglichkeit mit Zecken in Kontakt zu kommen ist hier, möglicherweise gerade auch für Stadtbewohner, naturgemäß gegeben (<http://www.sueddeutsche.de/wissen/artikel/322/10312/>). Daher war es von besonderem Interesse das Vorkommen von FSMEV in gerade diesen Zeckenpopulationen zu ermitteln.

5.1.2. Mäuse

Mäuse wurden in den Gebieten Erlangen, Traunstein und Grafrath gefangen. Auch diese Gebiete stellen beliebte Naherholungsgebiete dar. Es wurden dabei bewusst Risiko- und Nichtrisikogebiete (im Sinne der RKI Definition) ausgewählt, um eventuelle Veränderungen in der Erregerverbreitung wahrnehmen zu können. Die Mäuse wurden mit Sherman Lebendfallen gefangen. Das Center of Disease Control (CDC) gibt für diese Fangmethode ein Fangquote von 15 % an (<http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/rodentmanual/text.pdf>). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Vorködertechnik eine Fangquote von 30 % erreicht. Dabei bleibt unklar, ob dies zurückzuführen ist auf die Vorködertechnik oder auf einen Anstieg der Mauspopulation, bedingt durch ein vorangegangenes Vollmastjahr. Dementsprechend wurden Fallen in Gebieten mit einer hohen Maudichte aufgestellt, womit die Wahrscheinlichkeit eine Maus zu fangen steigt. Bei den Fangergebnissen ist zu beachten, dass die Anzahl der gefangenen Tiere einer bestimmten Mausart

keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Verbreitung dieser Art im jeweiligen Gebiet zulässt (Stickel, 1948). Denkbar ist auch eine durch die Fangtechnik bedingte Selektion. So werden möglicherweise die Trittmechanismen der Sherman Lebendfallen durch schwerere Mäuse besser ausgelöst, als durch leichte Tiere. So kann es durchaus sein, dass zwar in einem Gebiet viele Wald- und Schermäuse leben, aber der Fallentyp für diese Art nicht geeignet ist. Von den 836 gefangenen Mäusen waren 347 Tiere Gelbhalsmäuse und 344 Rötelmäuse. Sie stellen somit die in dieser Untersuchung die am häufigsten gefangenen Mausarten dar. Dies geht konform mit Aussagen anderer Autoren, die ebenfalls größtenteils diese Arten fangen konnten (Vostal & Žakovká, 2003). Mögliche Gründe hierfür könnten in der Fangmethodik zu suchen sein, aber auch in der Tatsache, dass es sich bei Gelbhals- und Rötelmäusen um die häufigsten in Zentraleuropa auftretenden Mausspezies handelt (Labuda *et al.*, 1997).

Für das Gebiet Traunstein fiel auf, dass der Anteil an gefangenen Langschwanzmäusen (Muridae) geringer war, als in den anderen Gebieten. Dies ist vermutlich auf die Ökologie dieses Fanggebiete zurückzuführen. Die Fauna entspricht eher dem Lebensraum der Arvicolidae. So wird etwa die Verteilung der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) stärker durch das Angebot und die Verteilung von spezifischen Mikrohabitatvariablen bestimmt (Chetnick & Mazurkiewicz, 1994). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Rötelmäuse beispielsweise vor allem unterwuchsreiche Standorte mit viel Fallholz, Reisig und Baumstrünken bevorzugten, wohingegen Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) solche Gebiete eher mieden (Schlund & Scharfe, 1993). In Waldgebieten mit hohem Laubholzanteil dominiert hingegen die Gelbhalsmaus gegenüber der Rötelmaus (Bäumler, 1981).

5.2. Diskussion der Untersuchungen im Zusammenhang mit FSMEV

5.2.1. E-Protein-Gen spezifische Pan-nested RT-PCR zum Nachweis von FSMEV spezifischen Nukleinsäuren

Mit der Zielsetzung möglichst viele FSMEV-Stämme zu detektieren, wurde eine neue RT-nested PCR etabliert. Dabei wurde auf eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität Wert gelegt. Sequenzen von 60 verschiedenen FSMEV-Stämmen aus 17 Ländern aus der Genbank wurden verglichen (Tabelle 29, Anhang, Kapitel 10.2.). Für die Primer Erstellung wurden auf Aminosäureebene konservierte Bereiche aus dem E-Protein-Gen herausgearbeitet. Als Positivkontrolle wurde für diese RT-nested PCR das Langat-Virus verwendet, da es im Labor unter L2-Bedingungen kultivierbar ist. Versuche, Flaviviren RNS als Positivkontrolle von anderen Institutionen zu erhalten, schlugen fehl (Referenzlabor für Flaviviren, Jena; Chiron Behring). Die neu etablierte RT-nested PCR ist als hochsensitiv anzusehen. Wichtig für die Untersuchung war, dass die PCR nicht durch Bestandteile des Probenmaterials inhibiert würde. Dies konnte durch Inhibitionsversuche ausgeschlossen werden. In gespikten Mausorganen wurde die gleiche Sensitivität ermittelt. Unter Zugabe von Zeckenmaterial erhöhte sich sogar die Nachweisgrenze der PCR um einen Faktor von 10 (0,04 TCID₅₀ Langat-Virus pro Reaktion). Somit erwies sich die neu etablierte RT nested PCR als 4000-fach sensitiver als eine bereits publizierte RT-PCR (nicht nested), (Ramelow *et al.*, 1993), die die Non-coding-region des FSMEV als Zielgen hat. Eine Sensitivitätserhöhung durch Zeckenmaterial konnte bereits in anderen Arbeiten beobachtet werden (Eistetter, 1997) und kann eventuell auf das Vorhandensein von Zecken RNS als stabilisierende Träger RNS für die virale Nukleinsäure zurückgeführt werden.

Wünschenswert bleibt es, weitere FSMEV-Stämme und andere Flaviviren mit der neu etablierten, hochsensitiven Methode zu testen, um die Spezifität der Methode zu bestätigen. Dies war im Rahmen der durchgeführten Laborarbeiten unter L2 Bedingungen nicht möglich.

5.2.2. Untersuchung der Zecken auf FSMEV

Bei der Untersuchung der Zecken auf FSMEV konnte mittels PCR in keinem der 212 untersuchten Zeckenpools FSMEV nachgewiesen werden. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde die Qualität der extrahierten RNS mittels einer internen Kontroll RT-PCR überprüft. Es konnte mittels, der an die Laborbedingungen angepassten 16S RNS Kontroll RT-PCR, mit Ausnahme eines Zeckenpools (0,5% der untersuchten Proben), in allen Proben entsprechende Amplifikate nachgewiesen werden. Eine potentielle Inhibition der PCR durch Probenmaterial wurde vorweg ausgeschlossen. Dies bestätigt, dass die Qualität des verwendeten Ausgangsmaterials für die durchgeführten Untersuchungen optimal war und keine Inhibition der Reaktionen in der Erreger-spezifischen RT-PCR stattfand. In einer von Schwaiger & Casinotti (2003) durchgeführten Studie, konnte lediglich bei 62 % der untersuchten Zecken die Qualität der extrahierten RNS bestätigt werden.

Es stellt sich daher umso mehr die Frage, warum trotz der hochsensitiven RT-PCR und der optimalen Qualität der RNS dennoch keine FSMEV positiven Zecken gefunden werden konnte. In Anbetracht der hohen Nachkommenzahl von Zecken (Kutzer, 1992), ist es denkbar, dass die Anzahl der untersuchten Zecken nicht ausreichend war. Aufgrund mangelnder Kenntnisse bezüglich der Prävalenz von FSMEV in Zecken, bleibt es jedoch schwierig den nötigen Stichprobenumfang zu bestimmen. Zudem konnte in anderen Untersuchungen gezeigt werden, dass die FSMEV-Prävalenz in adulten Zecken höher ist, als in Larven- oder Nymphenstadien (Süss *et al.*, 2002). Auch, dass bei dieser Studie ein hoher Anteil an Larven- und Nymphenstadien untersucht wurde, könnte ein Grund sein, weshalb keine positiven Zecken gefunden wurden. Die Tatsache, dass in keinem der 212 untersuchten Zeckenpools (1552 Zecken) FSMEV gefunden wurde, lässt statistisch folgende Aussage zu: Mit einer 95 % Wahrscheinlichkeit ist die Prävalenz mit $< 0,2\%$ anzugeben. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Untersuchungen überein, in denen die FSMEV-Prävalenz, zum Teil selbst in Endemiegebieten, mit 0% - $2,3\%$ angegeben wird (Süss *et al.*, 1999; Süss *et al.*, 2002; Oehme *et al.*, 2002).

Das vorliegende Ergebnis könnte auf eine niedrige FSMEV Infektionsgefahr in den öffentlichen Parkanlagen Münchens und im Waldgebiet Schöngesing, im Landkreis Fürstenfeldbruck hindeuten. Es muß jedoch unbedingt bedacht werden, dass ein solches Ergebnis jeweils nur als eine Momentaufnahme des Erregergeschehens im jeweiligen Fangareal angesehen und gewertet werden kann. Weitere Probennahmen

in den untersuchten und auch weiteren Gebieten müssen die erhaltenen Ergebnisse überprüfen, um das Infektionsrisiko einwandfrei abschätzen zu können.

5.2.3. Untersuchung der Mäuse auf FSMEV

In keiner der 300 untersuchten Milzproben sowie in keinem der 59 untersuchten Gehirne konnte FSMEV nachgewiesen werden. Die Qualität der verwendeten RNS wurde durch eine an die Laborbedingungen angepasste interne Kontroll-PCR überprüft. Diese, zur Qualitätssicherung unentbehrliche Untersuchung, wurde bislang in keiner der durchgeführten Studien zum Vorkommen von FSMEV in Wildmäusen durchgeführt (z.B. Takeda *et al.*, 1999). Mittels der Cytochrom b Gen spezifischen Kontroll PCR konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich in neun Proben (3 %) keine spezifischen Amplifikate nachgewiesen werden. Die Screeningergebnisse der Milz- und Hirnproben mittels der E- Protein Gen spezifischen RT-PCR können somit als zuverlässig eingestuft werden. Auch hier stellt sich die Frage, warum trotz der als zuverlässig eingestuften Methode keine FSMEV positiven Tiere gefunden werden konnten. So muß bedacht werden, dass auch hier nur ein kleiner Ausschnitt aus einer Mauspopulation gefangen und untersucht werden kann. Zudem ist das Vorkommen des Erregers sehr stark abhängig von den Populationen der Reservoirre. So dienen beispielsweise Rehe und Schafe zwar der Zecke als Wirt, sie begünstigen jedoch nicht die Übertragung von FSMEV auf die an ihnen saugenden Zecken (Labuda *et al.*, 1997; Steele & Randolph, 1985)

Es wird angenommen, dass der Infektionszyklus des FSMEV nur aufrechterhalten werden kann, wenn dieses Reservoir beständig vorhanden ist und entsprechende Zeckenpopulationen präsent sind (Dobler G., pers. Kom.). Daher werden weitere Untersuchungen zu verschiedenen Jahreszeiten und an anderen Standorten zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse unbedingt notwendig sein. Ebenso würde eine serologische Untersuchung Aufschluss von möglichen FSME-Infektionen über ein größeres Zeitfenster hinweg geben.

5.3. Diskussion der Untersuchungen im Zusammenhang mit Borrelien

5.3.1. OspA-Gen spezifische nested PCR zum Nachweis von *Borrelia* sp.

Für die Untersuchung der Mäuseohren auf Borrelien wurde eine für das OspA-Gen spezifische nested PCR verwendet. Das Ziel war es auch hier eine zuverlässige Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität zu etablieren. Dazu wurden Primer bereits veröffentlichter PCRs (Huegli *et al.*, 2002; Zumstein *et al.*, 1992) modifiziert und die PCR den Laborbedingungen angepasst. Unterschiedliche Borrelien-Stämme, verschiedener OspA-Typen, wie durch Michel *et al.* (2003) mittels RFLP definiert, wurden mit dieser nested PCR getestet. Alle Proben konnten dabei von der neu etablierten PCR detektiert werden. Um die Spezifität der PCR zu überprüfen wurde ein hochtitriger Leptospirenstamm in die PCR eingesetzt. Dieser wurde von der PCR nicht detektiert, womit die Spezifität der Methode bestätigt wurde. Auch für diese nested PCR wurde im Vorfeld die Inhibition durch Probenmaterial ausgeschlossen. Zu diesem Zweck wurden Mausohren mit *Borrelia burgdorferi* gespickt, um mittels der nested PCR die Nachweisgrenze festzustellen. Die etablierte PCR kann als zuverlässige, sensitive und Borrelien spezifische Testmethode angesehen werden.

5.3.2. Statistische Auswertung über den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Prävalenz

In 836 gefangenen und untersuchten Wildmäusen konnten in 91 Tieren Borrelien spezifische Amplifikate nachgewiesen werden. Hieraus ergibt sich eine Gesamtprävalenz von 11 %. Bei in Deutschland durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Prävalenz von *B. burgdorferi* wurde die ermittelte Prävalenz zwischen 10 und 27 % angegeben (Mautner *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1985; Wilske *et al.*, 1987). Mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests nach Pearson und des T-Tests sollte die Bedeutung verschiedener Einflussfaktoren auf die Borrelien Prävalenz untersucht werden. Bereits in verschiedenen Arbeiten wurden *Borrelia* sp. aus Wildmäusen isoliert (Huegli *et al.*, 2002; Hovmark *et al.*, 1988), es erfolgte jedoch nie eine statistische Auswertung mehrerer Einflussfaktoren auf Borrelien-Infektionen. Die vorliegende Arbeit enthält erstmals eine detaillierte Auswertung von Erreger-Wirt Daten. So wurden Faktoren wie Mausspezies, Fangorte, geschlechtsspezifische Merkmale und Gewicht ebenso wie Kopf-Rumpf-Länge, BMI sowie Parasitenbefall auf ihren Einfluss bezüglich der Borrelien-Befallshäufigkeit der Mäuse überprüft. In

dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass das Geschlecht keinen Einfluß auf die Befallshäufigkeit hat, obwohl dies der erhöhte Aktionsradius der männlichen Tiere vermuten lies (Corbet & Ovenden, 1982; MacDonald & Barrett, 1993). Auch wurde ermittelt, dass weder der Trächtigkeitzzustand, noch der BMI Einfluß auf den Borrelien-Befall der Mäuse nehmen. Jedoch konnte festgestellt werden, dass bei Rötelmäusen die Kopf-Rumpflänge (KR) sowie das Gonadengewicht als Einflussfaktor bezüglich des Borrelien-Befalls gesehen werden können. Dabei konnten in der Sektion keine pathologisch-anatomischen Veränderungen der Gonaden festgestellt werden, so dass eine Gonadenvergrößerung aufgrund Krankheit als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Auch waren zumeist Mäuse mit höherem Gewicht mit Borrelien infiziert. Die eben genannten Faktoren lassen sich wahrscheinlich auf das Alter der Tiere zurückführen, wobei ältere Tiere vermutlich schwerer und größer sind. Die Wahrscheinlichkeit bei älteren Tieren, bereits mit dem Erreger in Kontakt gekommen zu sein, bedingt durch den intensiveren Kontakt zum Vektor Zecke, liegt naturgemäß höher, als bei Jungtieren (Dorn *et al.*, 1999). Auch der Fangort konnte als wichtiger Einflussfaktor für die Infektionswahrscheinlichkeit herausgearbeitet werden. Zusätzlich konnte für die einzelnen Fangorte eine jahreszeitlich Schwankung der Borrelien-Infektionen beobachtet werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Prävalenzstudie aus der Schweiz, bei der Spirochäten aus dem Blut von Wildmäusen isoliert wurden. Die Autoren konnten saisonale Schwankungen bezüglich der Borrelien-Infektionen beobachten (Humair *et al.*, 1993). Eine jahreszeitliche Häufung der Borrelien-Infektionen wurde dort bestätigt. Jahreszeitliche Häufungen könnten einen Hinweis auf die Erregeraktivität geben. Interessanterweise konnte für jedes Fanggebiet ein unterschiedliches jahreszeitliches Prävalenzmaximum festgestellt werden. So wurde in Erlangen für den Monat August die höchste Prävalenz ermittelt. In Grafrath hingegen konnten die meisten Borrelien positiven Mäuse in den Monaten April und Dezember gefangen werden. Für Traunstein wurde die höchste Prävalenz im Juli ermittelt. Diese Unterschiede sind möglicherweise durch die geographischen und klimatischen Gegebenheiten zu erklären. Da aber in den Gebieten Erlangen und Traunstein im Monat Dezember keine Mäuse mehr gefangen wurden, müssten hier weitere Untersuchungen vorgenommen werden, um die jahreszeitlichen Schwankungen letztendlich beurteilen zu können. Dies gilt im Besonderen für das Fanggebiet Traunstein, in dem das niedrigste Fangergebnis erzielt wurde. Eine in Thüringen

durchgeführte Untersuchung konnte zeigen, dass die Übertragung des Erregers von Zecken auf Mäuse im Verlauf des Jahres deutlich anstieg (Dorn *et al.*, 1999). Auch dies könnte eine Erklärung für die jahreszeitlichen Schwankungen der Borrelien-Infektionen sein. Ein möglicher Schluß der aus den fangortspezifischen Prävalenzen gezogen werden könnte ist, dass sich das Risiko, mit Borrelien infiziert zu werden, für die drei Gebiete unterscheidet. Die ermittelten Prävalenzen sollten aber vielmehr als Basis für weitere Untersuchungen angesehen werden. Welche Faktoren letztendlich für den signifikanten Unterschied zwischen den Fangorten ausschlaggebend sind, kann hier nicht beurteilt werden. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind umfangreiche ökologische Studien erforderlich.

Ein Faktor der sich deutlich als Einflußgröße bezüglich des Borrelien-Befalls herauskristallisierte, war der Parasitenbefall. Dabei waren, sowohl Zeckenbefall, als auch Floh- und Haarlingsbefall, ein prädestinierender Faktor für Borrelien-Infektionen. Hier wird die Effektivität des Vektors Zecke verdeutlicht, die mit ihrer langen Lebensdauer und der Fähigkeit zur transstadialen Infektionsübertragung die Infektion erleichtert (Randolph *et al.*, 1999; Liebisch & Liebisch, 2003). Die von den Mäusen abgesammelten Zecken wurden, nicht auf Borrelien hin untersucht. Hierin wäre jedoch ein weiterer aufschlussreicher Untersuchungsaspekt zu sehen. Da sowohl Mäuse mit Floh-, als auch mit Haarlingsbefall häufiger mit Borrelien befallen waren stellt sich die Frage, ob der Befall mit diesen Parasiten Ursache oder Folge der Borrelien-Infektion ist. Weitere Studien, zur Klärung dieses Sachverhalts sind daher unabdingbar.

5.4. Molekulare Analysen

Ein Großteil der Borrelien positiven Proben konnte mittels Sequenzanalyse, anhand von Vergleichen des OspA Gens als *B. afzelii* identifiziert werden. Das Ergebnis einer im Jahr 2003 in Deutschland durchgeführten Studie, bei der die Borrelien Prävalenz in Zecken bestimmt wurde und dabei *B. garinii* die am häufigsten vertretene Genospezies war, konnte nicht bestätigt werden. Jedoch wurde in der selben Studie für das Gebiet Traunstein eine Häufung der Genospezies *B. afzelii* festgestellt, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konform geht (<http://www.IFAS.bayern.de>, Fingerle V., pers. Kom.). In einer von Wilske (2002) durchgeführten Untersuchung wurden sowohl Zecken, als auch Hautproben auf *Borrelia sp.* untersucht. In den untersuchten Zecken wurde vorwiegend *B. garinii* (71 %) gefunden, wobei *B. afzelii* nur zu 9 % in den Zecken detektiert wurden. In den untersuchten Hautproben hingegen war *B. afzelii* mit 84 % dominierend vertreten, wohingegen *B. garinii* (10 %) weniger häufig gefunden wurde.

5.5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist die erste Studie, in der Erreger-Vektor-Ökologie Interaktionen detailliert untersucht wurden. Dabei ergaben sich einige neue Fragestellungen. So bleibt zum Beispiel offen, warum sich die jahreszeitlichen Häufungen der Borrelien-Infektionen für die ausgewählten Fangorte derart unterscheiden, oder welche Rolle Flöhe und Milben im Erregergeschehen einnehmen. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen zu verschiedenen Jahreszeiten sowie an weiteren Standorten anzustreben, um das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Faktoren zu verstehen. Da aufgrund der geringen Prävalenz des Erregers kein FSMEV gefunden wurde, wäre es wünschenswert zusätzlich serologische Untersuchungen durchzuführen, die Aufschluss über mögliche vorangegangene FSME-Infektionen geben könnten.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen der Erreger FSMEV und *Borrelia sp.* in Zecken und Wildmäusen in ausgewählten Gebieten Bayerns zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurden insgesamt 836 Wildmäuse in den Gebieten Erlangen, Grafrath und Traunstein sowie 1552 Zecken in Münchens Parkanlagen und in Schöngeising gefangen. Für die Untersuchung der Proben erfolgte die Etablierung neuer, hochsensitiver nested PCRs. Für das FSME-Virus wurde das Hüllgen-(E-) Protein als Zielgen verwendet und eine Nachweisgrenze von 0,4 TCID₅₀ ermittelt. Zum Nachweis von Borrelien DNS diente das OspA-Gen, die Nachweisgrenze betrug 64 DNS Moleküle pro PCR Ansatz. Die Spezifität konnte anhand von 11 Stämmen gezeigt werden. Eine Inhibition der PCRs durch Probenmaterial wurden in Vorversuchen ausgeschlossen. Um die Qualität der extrahierten RNS bestätigen zu können, wurden interne Kontrollen durchgeführt, die sogenannte *house-keeping* Gene (Zecke: 16sRNS; Maus: Cytochrom b) als Zielsequenz hatten. Positive Proben wurden sequenziert und die ermittelten Daten für phylogenetische Analysen verwendet.

In keiner der untersuchten 359 Wildmausproben und 1552 Zeckenproben konnte FSMEV nachgewiesen werden, was auf ein niedriges Infektionsrisiko mit FSMEV in den Landkreisen Erlangen, Fürstentfeldbruck, Traunstein und München hinweisen könnte.

In 836 Wildmausproben konnte in 91 Proben Borrelien DNS nachgewiesen werden, womit sich eine Gesamtprävalenz von 11 % ergab. Für das Gebiet Traunstein wurde mit 34 % die höchste Borrelien-Prävalenz ermittelt. In Erlangen lag die Prävalenz in den untersuchten Proben bei 26 % und in Grafrath ergab sich eine Borrelien Prävalenz von 6 %. Dabei war *B. afzelii* in allen Fanggebieten die am häufigsten isolierte Spezies (81 %). *B. burgdorferi* wurde in 6 %, *B. garinii* in 2 % der untersuchten Proben isoliert. Parasitenbefall, Gewicht und Gonadengröße konnten als Einflussfaktoren für die Befallshäufigkeit mit Borrelien ermittelt werden. Ebenso konnte eine jahreszeitliche Häufung der Borrelien-Infektionen beobachtet werden, die sich jedoch in den untersuchten Regionen unterschied.

Da diese Untersuchung nur eine Momentaufnahme des Erregergeschehens in den ausgewählten Gebieten widerspiegelt, werden in Zukunft weitere Studien erforderlich sein, auch um Veränderungen in der Erregerdynamik und der Erreger-Wirts-Beziehung erfassen zu können.

Summary

Investigation on the occurrence of TBEV & *Borrelia* sp. in selected mouse and tick populations of Bavaria

This study determines the occurrence of TBEV and *Borrelia* sp. pathogens in ticks and wild mice in selected areas of Bavaria / Germany. The sample consisted of 836 wild mice, collected from the districts of Erlangen, Grafrath and Traunstein, and 1552 ticks, collected in public parks of the city of Munich and the Schöngesing area.

This material was analyzed with newly established and highly sensitive nested PCRs. Using the envelope- protein as a target gene, a detection threshold of 0,4 TCID₅₀ could be achieved for the TBEV- gene. *Borrelia* DNA detection threshold was 64 molecules of DNA per PCR session (target: *OspA*- gene).

Specificity could be demonstrated by using eleven different strains of *Borrelia*. A possible inhibition of the PCRs by the sampled material could be ruled out in preliminary tests. Internal controls, using so called 'house-keeping-genes' (tick: 16S RNA; mouse: cytochrome b) as target sequences, showed the quality of extracted RNAs being on a high level. Positive hits were sequenced and the results underwent phylogenetical analysis.

TBEV could not be detected in any of the 359 wild mice and 1552 ticks. In view of this fact, the risk of infection within the administrative districts of Erlangen, Fürstenfeldbruck, Traunstein, and Munich appears to be low.

Borrelia DNA was found in 91 of 836 mouse-samples, which results in an overall prevalence of 11 %. The area around Traunstein showed the highest *Borrelia* prevalence (34 %). The corresponding values for Erlangen (26 %) and Grafrath (6 %) were much lower. Among the different strains, *Borrelia afzelii* was the one most often isolated (81 %), which is true for all the areas. *Borrelia burgdorferi* could be found in 6 %, *Borrelia garinii* in 2 % of the analyzed samples.

Parasitic infestation, weight and gonad size turned out to be influencing factors for the probability of *Borrelia* infection. Additionally, a seasonal increase of *Borrelia* infections was noticeable, in a varying degree however, depending on the individual region. Given that this study only reflects the present activity of TBEV and *Borrelia* sp. pathogens in specific local areas, further research will be necessary in order to cover and comprehend dynamic changes and interactions between pathogens and hosts.

Résumé

Etude de la prévalence des virus de l'encéphalite à tique et de *B. burgdorferi* dans quelques populations sélectionnées des mulots, des campagnols et des tiques en Bavière

L'objectif de l'étude voici présent était d'étudier la prévalence des agents infectieux tels que la méningoencéphalite à tiques et la borreliose parmi les tiques et les rongeurs forestiers dans quelques régions en Bavière. Ainsi 836 rongeurs forestiers ont été capturés dans les régions d'Erlangen, de Grafrath et de Traunstein et 1552 tiques ont été collectionnées dans les parcs munichois et le territoire Schöngesing. Pour l'investigation des échantillons il y a eu l'établissement des nouveaux nested PCR à haute sensibilité. Pour le flavivirus de l'encephalite le target utilisé était la protéine E de l'enveloppe et la limite de détection se présentait de 0,4 TCID₅₀.

Pour la détection de L'ADN des borrelies servait le gène OspA et la limite de détection était 64 molécules d'ADN pour l'échantillon. La spécificité a pu être montrée à l'aide de 11 souches. Due aux essais pilotes il était possible d'exclure l'inhibition de la réaction PCR causée par le matériel de l'échantillon. Pour approuver la qualité de l'ARN extrait des contrôles internes ont été effectués avec les housekeeping gènes comme target (tique: 16sARN, souris: cytochrome b). Les dates obtenus par séquençage ont été utilisés pour les analyses phylogénétiques.

L'agent infectieux de l'encéphalite à tiques n'a pas pu être trouvé dans les 359 échantillons des rongeurs forestiers ni dans les 1552 échantillons des tiques. Ceci indique un risque basse de l'infection dans les régions Erlangen, Fürstenfeldbrück, Traunstein et München.

Dans 91 parmi les 836 échantillons des rongeurs forestiers l'ADN des borrelies a été détecté, indiquant une prévalence générale de 11 %. La prévalence des borrelies la plus élevée se trouvait à Traunstein avec 34 %. La prévalence à Erlangen mesurée dans les échantillons était 26 % et à Grafrath 6 %. L'espèce le plus souvent isolée dans les différentes régions était *B. afzelii* (81 %). *B. burgdorferi* a été isolé en 6% et *B. garinii* en 2 % des cas. Quelques facteurs ayant une influence sur la prévalence des borrelies ont été déterminés: la prévalence des parasites, le poids et le poids des gonades. Une fréquence de la détection des borrelies liée à la saison était observable mais différait selon les régions étudiées.

Comme cette étude reflète uniquement la situation momentanée des agents infectieux dans les régions choisies, il est important pour l'avenir d'effectuer d'autres

études pour cerner des changements dans la dynamique des agents infectieux et la relation agent infectieux et l'hôte.

7. Literaturverzeichnis

- Allison S. L., Schalich J., Stiasny K., Mandl C. W., Kunz C. and Heinz F. X., 1995: Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acid pH, *J. Virol.*, 69, 695- 700
- Altschul, Stephen F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lippman D. J., 1997: Gapped Blast and Psi- Blast: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389- 3492
- Anderson R. M. and May R. M., 1991, *Infectious disease of humans. Dynamics and Control*, Oxford Univ. Press, Oxford
- Appel M. J., Allan S., Jacobson R. H., Lauderdale T. L., Chang Y. F., Shin S. J., Thomford J. W., Todhunter R. J., Summers B. A., 1993: Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection, *J. Infect. Dis.*, 167, 651- 664
- Baranton G., Postic D., Saint G., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A., 1992: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 378- 383
- Baranton G., Seinost G., Theodore G., Postic D., Dykhuizen D., 2001: Distinct levels of genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* are associated with different aspects of pathogenicity, *Res. Microbiol.*, 152, 149- 156
- Barbour A. G., Hayes S. F., 1986: Biology of *Borrelia* species, *Microbiol. Rev.*, 50, 381- 400
- Bäumler W., 1981: Die Verbreitung von Mäusen in verschiedenen Waldgebieten Bayerns, *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz*, 54, 99- 104
- Berglund J., Eitrem R., Ornstein K., Lindberg A., Ringer A., Elmrud H., Carlsson M., Runehagen A., Svanborg C., Norrby R., 1995: An epidemiologic study of Lyme disease in Southern Sweden, *N. Engl. J. Med.*, 333, 1319- 1327
- Breitschwerdt E. B., Nicholson W. L., Kiehl A. R., Steers C., Meuten D. J. and Levine J. F., 1994: Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida, *J. Clin. Microbiol.*, 32, 352- 357

- Brown J. P., Zachary J. F., Teuscher C., Weis J. J. and Wooten R. M., 1999: Dual role of Interleukin- 10 in murin Lyme disease: Regulation of arthritis and host defense, *Infect. Immun.*, 67, 5142- 5150
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Da J. P., 1982: Lyme disease- a tick- borne spirochetosis?, *Science*, 216, 1317- 1319
- Burgess E. C., Gendron- Fitzpatrick A., Wright W. O., 1987: Arthritis and systemic disease caused by *Borrelia burgdorferi* infection in a cow, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191, 1468- 1470
- Burgess E. C., Mattison M., 1987: Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 191, 1457- 1458
- Burgess E. C., 1988: *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows, *Ann. NY Acad. Sci.*, 539, 235- 243
- Burgess E. C., 1992: Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*, *Am. J. Vet. Res.*, 53, 1507- 1511
- Calisher C. H., Karabatsos N., Dalrymple J. M., Shope R. E., Porterfield J. S., Westaway E. G., Brandt W. E., 1989: Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera, *J. Gen. Virol.*, 70, 37- 43
- Campbell M. S. and Pletnev A. G., 2000: Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence, *Virology* 269, 225-237
- Casjens S., Palmer N., Van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O. and Fraser C. F., 2000: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*, *Molecular Microbiology*, 35, 490- 518
- Chambers TJ., Hahn CS., Galler R., Rice CM., 1990: Flavivirus genome organization, expression and replication, *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 649- 688
- Charon N. W., Goldstein S. F., 2002: Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: the spirochetes, *Annu. Rev. Genet.*, 36, 47- 73
- Chetnick W., Mazurkiewicz M., 1994: Dispersion of the bank vole in fine- and coarse-grained mosaics of deciduous and mixed coniferous forests, *Acta Theriologica* 39, 127- 142

- Chunikhin S. P., Kurenko V. B., 1979: Viremia in *Clethrionomys glareolus*: A new ecological marker of tick-borne encephalitis virus, *Acta Virol. (Praha)*, 23, 257-260
- Clarke D. H., 1964: Further studies on antigenic relationships among the virus of the group B tick-borne complex, *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 45-56
- Comstock L. E., Fikrig E., Shoberg R. J., Flavell R. A. and Thomas D. D., 1993: A monoclonal antibody to OspA inhibits association of *Borrelia burgdorferi* with human endothelial cells, *Infect. Immun.*, 61, 423-431
- Corbet G., Ovenden D., 1982: *Pareys Buch der Säugetiere*, Hamburg; Berlin, Parey Verlag,
- Dekonenko A., Yakimenko V., Ivanov A., Morzov V., Nikitin P., Khasanova S., Dzagurova T., Tkachenko E., Schmaljohn C., 2003: Genetic similarity of puumala virus found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin, *Infection, Genetics and Evolution*, 3, 254-257
- Donahue J. G., Piesman J., Spielman A., 1987: Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36, 92-96
- Dorn W., Messutat S., Kipp S., Feldmann A., Sünder U., 1999: Seasonal variations in the infestation of rodents with *Ixodes ricinus* Linnaeus and prevalence of *Borrelia* infections in a habitat of the Ilm-Valley, *Zbl. Bakt.*, 289, 696-697
- Dumpis U., Crook D. and Oksi J., 1999: Tick-borne encephalitis, *Clin. Infect. Dis.*, 28, 882-890
- Ecker M., Allison S. L., Meixner T. and Heinz F. X., 1999: Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia, *J. Gen. Virol.*, 80, 179-185
- Eckert J. 1998: Zecken, In: Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., Zinkernagel, R., *Medizinische Mikrobiologie*, 9. Auflage, Stuttgart/ New York, Georg Thieme Verlag, 622
- Eistetter S., 1997: Untersuchung zur Epidemiologie der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Baden Württemberg; Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Parasitologie des Institutes für Zoologie der Universität Hohenheim

- Faulde M. K., 1998: Krankheitserreger- übertragende Tiere- Grundsätzliches über Vektoren, *Der prakt. Schädlingsbekämpfer*, 50, 19- 26
- Faulde M. K., 2004: Ratten und Mäuse- unterschätzte Überträger und Reservoir für gefährlicher Infektionskrankheiten, *Hyg. Med.*, 29, 6
- Felsenstein J., 1989: PHYLIP- Phylogeny Inference Package, *Cladistics*, 5, 164- 166
- Fernández J. G., Fernández M. R., Murillo F. N., Maroto Vela M. d. C., 1997: Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*, *Microbios*, 91, 165- 174
- Fingerle V., Hauser U., Liegl G., Petko B., Preac- Mursic V., Wilske B., 1995: Expression of outer surface protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*, *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1867- 1869
- Fingerle V., 2001, auf CD-ROM: Wilke B., Fingerle V., Herzer P., Pfister H.- W., Pohl- Koppe A., Weber K., Lyme- Borreliose, Version 1.0, Grenzach- Wyhlen, Hoffmann- La Roche AG, CASUS ® by INSTRUCT AG
- Fischer A., Leuterer G., 1992: *Borrelia burgdorferi* assoziierte Lymphadenitis purulenta bei einem Hund, *Kleint. Prax.*, 37, 13- 16
- Fischer J. R., Parveen N., Magoun L. and Leong J. M., 2003: Decorin- binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type- specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, *PNAS*, 100, 7307- 7312
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K., Dodson R., Hickey E. K., Dougherty B., Tomb J.- F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbusch J., Salzberg S., Hanson M., Van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Wathley L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O. and Venter J. C., 1997: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdoerferi*, *Nature*, 390, 580- 586
- Gern L., Rais O., 1996: Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae), *J. Med. Entomol.*, 33, 189- 192
- Gern L., Estrada- Peña A., Frandsen F., Gray J. S., Jaenson T. G. T., Jongejan F., Kahl O., Korenberg E., Mehl R. and Nuttall P. A., 1998: European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Zbl. Bakteriol.*, 287, 196- 204
- Gerold P., 2001: Tagungsbericht: Frühsommer- Meningoenzephalitis (FSME) in Europa, *Impf Dialog*, 2, 91- 95

- Gratz N. G., 1999: Emerging and resurging vector- borne diseases, *Annu. Rev. Entomol.*, 44, 51- 75
- Grěsiková M., Sekeyová M., Weidnerová K., Blaškovič D., Steck F., Wandeler A., 1972 a: Isolation of tick- borne encephalitis virus from the brain of a sick dog in Switzerland, *Acta Virol.*, 16, 88
- Grěsiková M., Weidnerová K., Nosek J., Rajčáni J., 1972 b: Experimental pathogenicity of tick- borne encephalitis virus for dogs, *Acta Virol.*, 16, 336- 340
- Grěsiková M., Kaluzová M., 1997: Biology of Tick-Borne Encephalitis Virus, *Acta virologica*, 41, 114- 124
- Gritsun T. S., Frolova T. V., Pogodina V. V., Lashkevich V. A., Venugopal K. and Gould E. A., 1993: Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses, *Virus Res.* 27, 201-209
- Gritsun T. S., Nuttall P. A. and Gould E. A., 2003: Tick- borne flaviviruses, *Adv.Virus Res.*, 61, 317- 371
- Gubler D. J., Reiter P., Ebi K. L., Yap W., Nasci R., Patz J. A., 2001: Climate variability and change in the United States: Potential impacts on vector- and rodent- borne diseases, *Environmental Health Perspectives*, 109, 223- 233
- Guirakhoo F., Heinz F. X., Mandl C. W., Holzmann H., Kunz C., 1991: Fusion activity of flavivirus: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions, *J. Gen. Virol.*, 72, 1323- 1329
- Guo B. P., Norris S. J., Rosenber L. C. and Höök M., 1995: Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglykan decorin, *Infect. Immun*, 63, 3467- 3472
- Guo B. P., Brown E. L., Dorward D. W., Rosenberg L. C. and Höök M, 1998: Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*, *Mol. Microbiol.*, 30, 711- 723
- Gustafson R., 1994: Epidemiological studies of Lyme borreliosis and tick- borne encephalitis, *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 92, 1- 63
- Hartmann K., 2000: In: Kraft W. und Hirschberger J.: Kleintierkrankheiten, Band I: Innere Medizin, 3. Auflage, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 146- 147
- Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., Mizutani T., Gojabori T. and Takashima I., 1999: Phylogenetic and virulence analysis of tick- borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia, *J. Gen. Virol.* 80, 3127-3135

- Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G. N., Goto A., Yoshii K., Mizutani T., Kariwa H. and Takashima I., 2001: Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia, *Gen. Virol.* 82, 1319-1328
- Heinz F. X., Roehrig J. T., 1990: Flaviviruses, *Immunochemistry of viruses. II. The Basis for Serodiagnosis and Vaccines*, 289- 305, Amsterdam, Edited by M.H.V. van Regenmortel & A. R. Neurath
- Heinz F. X., Mandl C. W., Holzmann H., Kunz C., Harris B. A., Rey F., Harrison S. C., 1991: The Flavivirus envelope protein E: Isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization, *J. Virol.*, 65, 5579- 5583
- Heinz F. X. and Mandl C., 1993: The molecular biology of tick-borne encephalitis virus, *APMIS* 101, 735- 745
- Heinz F. X., 1999: Tick-borne encephalitis virus: Advances in molecular biology and vaccination strategy in the next century, *Zbl. Bakt.*, 289, 506- 510
- Heinz F. X., Collett M. S., Purcell R. H., Gould E. A., Howard C. R., Houghton M., Moormann R. J., Rice C. M. and Thiel H. J., 2000: Family *Flaviviridae*. In "Virus Taxonomy. 7th International Committee for the Taxonomy of Viruses" (Fauquet C. M., Bishop D. H. L. and Carstens *et al.*, eds.). 859- 878, Academic , San Diego
- Heinz F. X. and Allison S. L., 2000: Structures and mechanism in flavivirus fusion, *Adv. Virus Res.*, 55, 231- 269
- Heinz F. X. and Allison S. L., 2001: The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes, *Curr. Opin. Microbiol.*, 4, 450- 455
- Heinz F. X. and Holzmann H., 2001: Tick- borne encephalitis, In: Service M. V., ed.: *The Encyclopedia of arthropod- transmitted infections*, Wallingford, UK, Cab international, 507- 512
- Heinz F. X., 2003: Molecular aspects of TBE virus research, *Vaccine*, 21, 3- 10
- Herzig R., Patt C. M., Prokes T., 2002: An uncommon severe clinical course of european tick- borne encephalitis, *Biomed. Papers*, 146, 63- 67
- Hinnebusch J & Barbour A. G., 1991: Linear plasmids of *Borrelia burgdorferi* have a telomeric structure and sequence similar to those of a eukaryotic virus, *J. Bacteriol.*, 173, 7233- 7239
- Holmgren E. B., Forsgren M., 1990: Epidemiology of tick- borne encephalitis in Sweden 1956- 1989: a study of 1116 cases, *Scand. J. Infect. Dis.*, 22, 287- 295

- Horst, H, 2003: In: Horst H.: Zeckenborreliose Lyme- Krankheit bei Mensch und Tier, 4. Auflage, Balingen, Spitta Verlag
- Hovmark A., Jaenson T. G., Asbrink E., Forsman A., Jansson E., 1988: First isolation of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in northern Europe, APMIS, 96, 917- 920
- Huegli D., Hu C. M., Humair P.-F., Wilske B., and Gern L., 2002: *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA Serotyp 4 in Switzerland, J. Med. Microbiol., 40, 4735- 4737
- Humair P. F., Turrian N., Aeschlimann A., Gern L., 1993: *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootic contribution of small mammals, Folia Parasitol. (Praha), 40, 65- 70
- Huppertz H.- I., Karch H., Suschke H. J., Doring E., Ganser G., Thon A., Bentas W., 1995: Lyme arthritis in European children and adolescents. The Pediatric Rheumatology Collaborative Group, Arthritis Rheum., 38, 361- 368
- Huppertz H.- I., Böhme M., Standaert S. M., Karch H., Plotkin S. A., 1999: Incidence of Lyme borreliosis in Würzburg region of Germany, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 18, 697- 703
- Huppertz H.- I. , Krause A., 2003: Lyme- Borreliose, Internist, 44, 175- 183
- Indest K. J., Howell J. K., Jacobs M. B., Scholl- Meeker D., Norris S. J., Philipp M. T., 2001: Analysis of *Borrelia burgdorferi* vlsE gene expression and recombination in the tick vector, Infect. Immun., 69, 7083- 7090
- Johnson R. C., Hyde F. W., Rumpel C. M., 1984 : Taxonomy of the Lyme disease spirochetes, Yale J., Biol. Med, 57, 529- 537
- Kahl O., 1994: Die Zecke als Vektor, In: Süss J., (ed.), Durch Zecken übertragbare Erkrankungen, Schriesheim, Weller Verlag, 1- 19
- Kaiser, 1995: Tick- borne encephalitis in Souther Germany, Lancet, 345, 463
- Kaiser, 1996: Tick- borne encephalitis in Southwestern Germany, Infection, 24, 398- 399
- Kaiser R., 2000: Epidemiologie und Verlauf der FSME in Baden-Württemberg zwischen 1994 und 1999. Eine retrospektive Studie an 731 Patienten. Dtsch. Med. Wochenschr., 125, 1147-1153.
- Kawabata H. Masuzawa T., Yanagihara Y., 1993: Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov., isolated from *Ixodes ovatus* in Japan, Microbiol. Immunol., 37, 843- 848

- Keirans J. E., 1992: Systematics of the Ixodidae: an overview and some problems, In: Fivaz B., Petney T., Horak I., editors: Tick vector biology. Medical and Veterinary Aspects, Berlin, Springer, 1- 21
- Kimmig P., 2004: Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) in Baden- Württemberg: Infektionsgefahr größer als bisher angenommen, www.landesgesundheitsamt.de/download/fsme_in_baden-wuerttemberg.pdf
- Knipe D. M., Howley P.M., Griffith D. E., Lamb R. A., Martin M. A., Roizman B., Straus S. E., 2001: Fields, Virology, Volume 1, Fourth Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins
- Kocher T. D., Thomas W. K., Meyer A., Edwards S. V., Pääbo S., Villablanca F. X., Wilson A. C., 1989: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6196- 6200
- Kocianova E., Kozuch O., Bakoss P., Rehacek J., Kovacova E., 1993: The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick- borne encephalitis virus and leptospirae in the foothills of southern Bavarian forest, Germany, Appl. Parasitol., 34, 283- 290
- Kožuch O., Chunikhin M., Grěsiková M., Nosek J., Kurenkov V. B., Lysy J., 1981: Experimental characteristics of viraemia caused by two strains of tick- borne encephalitis virus in small rodents, Acta Virol., 25, 219- 224
- Kožuch O., Labuda M., Lysý J., Weismann P., Krippel E., 1990: Longitudinal study of natural foci of central european encephalitis virus in west slovakia, Acta virol., 34, 537- 544
- Kožuch O., Guryčová D., Lysý J., Labuda M., 1995: Mixed natural focus of tick-born encephalitis, Tularemia and haemorrhagic fever with renal syndrome in west slovakia, Acta virol. 39, 95- 98
- Kraft W., 1996: In: Kraft W., Dürr U. M.: Katzenkrankheiten, 4. Auflage, Alfeld, Verlag M. & H. Schaper, 206
- Kraft W., 2000: In: Kraft W., Hirschberger J.: Kleintierkrankheiten, Band I: Innere Medizin, 3. Auflage, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 160- 161
- Kunz C., 1999: TBE- a risk factor for travellers, Zbl. Bakteriol., 289, 511- 512
- Kurtenbach K., Sewell H.- S., Schäfer S. M., Etti S. and De Michaelis S., 1999: Biology, Ecology and Systematics of the Genus *Borrelia*, Zbl. Bakteriol., 289, 639- 642

- Kurtti T. J., Munderloh U. G., Krueger D. E., Johnson R. C. and Schwan T. G., 1993: Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) and maintenance of infectivity, *J. Med. Entomol.*, 30, 586- 596
- Küthe K., Krämer K., 1961: Schäden durch Rötelmaus und Erdmaus im Forst, *Anzeiger für Schädlingskunde*, 33, 135- 137
- Kutzer E., 1992: Arthropoden, In: Eckert, J., Kutzer, E., Rommel, M., Bürger, H.J., Körting W., *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 4. Auflage, Berlin/ Hamburg, Verlag Paul Parey, 325- 329
- Labuda M., Jiang W. R., Kaluzova M., Kožuch O., Nuttall P. A., Weismann P., Eleckova E., Zuffova E. and Gould E. A., 1994: Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein, *Virus Res.* 31 (3), 305-315
- Labuda M., Kožuch O., Lysý, 1997: Tick-borne encephalitis virus natural foci in Slovakia: ticks, rodents, and goats, In: Tick-borne encephalitis and Lyme Borreliosis, 4th International Potsdam Symposium on Tick-borne diseases, Süss J & Kahl O., Lengerich, Pabst Science Publishers, 34- 46
- Labuda M., Kožuch O., Zuffová E., Elecková E., Hails R. S., Nuttall P. A., 1997: Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodents hosts, *Virology*, 235, 138- 143
- Labuda M. and Randolph E., 1999: Survival Strategy of tick-borne encephalitis virus: Cellular basis and environmental determinants, *Zbl. Bakteriol.*, 289, 513- 524
- Galal V., Postic D., Baranton G., 2002: Molecular diversity of ospC gene in *Borrelia*, Impact on phylogeny, epidemiology and pathology, *Wien Klin. Wochenschr.*, 114, 562- 567
- Lam T. T., Nguyen T.- P. K., Montgomery R. R., Kantor F., Fikrig E., Flavell R. A., 1994: Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, *Infect. Immun.*, 6, 290- 298
- Le Fleche A. M., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G., 1997: Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. Nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 921- 925
- Lescar J., Roussel A., Wien M. W., Navaza J., Fuller S. D., Wengler G., Wengler G., Rey F. A., 2001: The fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an

- icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH, *Cell*, 105, 137- 148
- Leschnik M. W., Kirtz G. C., Thalhammer J. G., 2002: Tick- borne encephalitis (TBE) in dogs, *J. Med. Microbiol.*, 291, Suppl. 33, 66- 69
- Liang F. T. and Philipp M. T., 1999: Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*, *Infect. Immun.*, 67, 6702- 6706
- Liebisch, G., Liebisch, A., Dyck, A., 1995: Studies on the tick bites in humans in Germany and infections with *Borrelia burgdorferi*, *Zentralbl. Bakt. Hyg.* 282, 179-180
- Liebisch G., 1997: Der Nachweis von Borrelien bei Haus- und Wildtieren: Patient oder Reservoir der Lyme- Borreliose? 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Bad Nauheim, 265- 270
- Liebisch A., Liebisch G., 2003: In: Horst H.: Zeckenborreliose Lyme- Krankheit bei Mensch und Tier, 4.Auflage, Balingen, Spitta Verlag
- Lindenbach B. D. and Rice C. M., 1999: Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function, *J. Virol.*, 73, 4611- 4621
- Lindgren E., Gustafson R., 2001: Tick- borne encephalitis in Sweden and climate changes, *Lancet*, 358, 16- 18
- Luckschander N., Kölbl S., Enzesberger O., Zipko H. T., Thalhammer J. G., 1999: Frühsommermeningoenzephalitis- (FSME) Infektion in einer österreichischen Pferdepopulation, *Tierärztliche Praxis, Großtiere*, 27, 235-238
- Lundkvist K., Vene S., Golovljova I., Mavtchoutko V., Forsgren M., Kalnina V. and Plyusnin A., 2001: Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes, *J. Med. Virol.* 65, 730-735
- MacDonald D., Barrett P., 1993: Mammals of Britain and Europe, Collins Field Guide, London, Glasgow, New York, Harper Collins Publishers
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Levine H. R., Levy S. A., 1990: Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 197, 63- 66
- Maiwald M., Petney T. N., Bruckner M., Kramer C., Rohler B., Beichel E., Hassler D., 1995: Natural epidemiology of Lyme borreliosis with reference to clustered

- incidence of illnesses in the suburbs of a North Baden community, *Gesundheitswesen*, 57, 419- 425
- Maiwald M., Oehme R., March O., Petney T. N., Kimmig P., Naser K., Zappe H. A., Hassler D., von Knebel- Doebritz M., 1998: Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany, *Epidemiol. Infect.*, 121, 103- 108
- Mandl C. W., Heinz F. X., Kunz C., 1988: Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses, *J. Virol.*, 166, 197- 205
- Mandl C. W., Heinz F. X., Stöckl E., Kunz C., 1989: Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (western subtyp) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses, *J. Virol.*, 173, 291- 301
- Martin Y., Gerlach G., Schlötterer C., Meyer A., 2000: Molecular phylogeny of european murid rodents based on complete cytochrome b sequences, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, 37- 47
- Mautner V. F., Gittermann M., Freitag V., Schneider E., 1990: Zur Epidemiologie der *Borrelia burgdorferi*- Infektionen. Abhängigkeit von der Durseuchungsrate von den serologischen Bestimmungsverfahren, *Nervenarzt*, 61, 94- 97
- McCarty C., 1998: Chromas©, Version 1.45;; School of Helth Science, Griffith University, Cold Coast Campus Southport, Queensland, Australia
- Michel H., Wilske B., Hettche G., Göttner G., Heimerl C., Reischl U., Schulte-Spechtel U., Fingerle V., 2003: An *ospA*- polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism- based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and *OspA* types, *Med. Microbiol. and Immunol.*, DOI 10.1007/s00430-003-0196-8, 1- 18
- Mickiené A., Vene S., Golovjova I., Laiškonis A., Lindquist L., Plyusnin A., Lundkvist Å., 2001: Tick-borne encephalitis virus from Lithuania, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 20, 886-8
- Modrow S., Falke D., Truyen U., 2003: *Molekulare Virologie*, 2. Auflage, Heidelberg/ Berlin, Spektrum Verlag
- Monath T. P., Heinz F. X., 1996: Flaviviruses, In: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P.M., Chanock R. M., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E.,

- Fields Virology, 3. Auflage, Philadelphia & New York, Lippincott- Raven Publishers, 961- 1034
- Montgomery R. R., Malawista S. E., Feen K. J. M., Bockenstedt L. K., 1996: Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: Exploration of the paradox of the early immune response to outer surface protein A and C in Lyme Disease, J. Exp. Med., 183, 261- 269
- Morozova O. V., Belyavskaya N. A., Zaychikov E. F., Kvetkova E. A., Must A. A., Pletnev A. G., 1991: Identification of RNA replicase subunits responsible for initiation of RNA synthesis of tick-borne encephalitis virus affinity labeling, Biomed Sci., 2, 183- 186
- Moshkin M., Gerlinskaya L., Morozova O., Bakhvalova V., Evsikov V., 2002: Behaviour, chemosignals and endocrine functions in male mice infected with tick-borne encephalitis Virus, Psychoneuroendocrinology, 27, 603- 608
- Muylaert I. R., Galler R., Rice C., 1997: Genetic analysis of the yellow fever virus NS1 protein: Identification of a temperature- sensitive mutation which blocks RNA accumulation, J. Virol., 71, 291- 298
- Noack R., 1997: TBE in children in Germany 1994- 1996, In: Tick- borne encephalitis and Lyme Borreliosis, 4th International Potsdam Symposium on Tick- Borne Disease, Süss J & Kahl O., Lengerich, Pabst Science Publishers, 153- 158
- Norris S. J., Carter C. J., Howell J. K., Barbour A. G., 1992: Low- passage- associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of Osp D, a surface- exposed, plasmid- encoded lipoprotein, Infect. Immun., 60, 4662- 4672
- Nuttall P. A., Labuda M., 1994: Tick- borne encephalitis subgroup, In: Sonenshine D. E., Thomas N. M.: Ecological dynamics of tick- borne zoonoses, New York, Oxford University Press, 351- 391
- Nuttall P. A., 1999: Pathogen- tick- host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE Virus, Zbl. Bakteriologie, 289, 492- 505
- Obonyo M., Munderloh U. G., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T., 1999: *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature, J. Med. Microbiol., 37, 2137- 2149
- O'Connell S., Granstrom M., Gray J. S., Stanek G., 1998: Epidemiology of European Lyme borreliosis, Zbl. Bakt., 287, 229- 240

- Oehme R., Hartelt K., Backe H., Brockmann S., Kimmig P., 2002: Foci of tick- borne diseases in Southwest Germany, *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 22- 29
- Ohnishi J., Piesman J., de Silva A. M., 2001: Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks, *PNAS*, 98, 670- 675
- Ormasen V., Brantsaeter A. B., Moen E. W., 2001: Tick- borne encephalitis in Norway (in Norwegian), *Tidsskr. Nor. Laegeforen*, 121, 807- 809
- Pal U., de Silva A. M., Montgomery R. R., Fish D., Anguita J., Anderson J. F., Lobet Y., Fikrig E., 2000: Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes Scapularis* mediated by outer surface protein A, *J. Clin. Invest.* 106, 561- 569
- Parker J. L., White K. K., 1992: Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature, *Cornell Vet.*, 82, 253- 274
- Parveen N., Caimano M., Radolf J. D., Leong J. M., 2003: Adaption of the Lyme disease spirochaete to the mammalian host environment results in enhanced glycosaminoglycan and host cell binding, *Mol. Microbiol.*, 47, 1433-1444
- Paster B. J., Dewhirst F. E., 2000: Phylogenetic foundation of spirochetes, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 341- 344
- Patrican L. A., 1997: Acquisition of Lyme disease spirochetes by cofeeding *Ixodes scapularis* ticks, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 57, 589- 593
- Pavlovski E. N., 1939: On natural focality of infectious and parasitic disease, *Vestn. Akad. Nauk SSR*, 10, 98- 100
- Pavlovski E. N., 1966: Natural nidality of transmissible disease, Urbana (IL): University of Illinois Press
- Peavy C. A., Lane R. S., Kleinjan J. E., 1997: Role of small mammals in the ecology of *Borrelia burgdorferi* in a peri- urban park in north coastal California, *Exp. Appl. Acarol.* 21, 596- 84
- Porcella S., Schwan T. G., 2001: *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms, *J. Clin. Invest.*, 107, 651- 656
- Posey J. E., Gherardini F. C., 2000: Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen, *Science*, 288, 1651- 1653
- Ramelow C., Süß J., Berndt D., Roggendorf M., Schreier E., 1993: Detection of tick- borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction, *J. Virol. Methods*, 45, 115- 119

- Randolph S. E., Gern L., Nuttall P. A., 1996: Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission, *Parasitol. Today*, 12, 472-479
- Randolph S. E., Miklisova D., Lysy J., Rogers D. J., Labuda M., 1999: Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis, *Parasitology*, 118, 177-186
- Read V. T., Malafant K. W. J., Myers K., 1988: A comparison of grid and index-line trapping methods for small mammal surveys, *Australian Wildlife Research*, 15
- Reimer B., Erbas B., Lobbichler K., Truckenbrodt R., Gartner-Kothe U., Kapeller N., Hansen M., Fingerle V., Wilske B., von Sonnenburg F., 1999: Seroprevalence of *Borrelia* infection in occupational tick-exposed people in Bavaria (Germany), 6th International Potsdam Symposium on tick-borne disease, Berlin, 26-27th April
- Reiner B., Fischer A., 1998: Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) beim Hund in Deutschland: Zwei Fallberichte, *Kleintierpraxis*, 43, 255-268
- Reiner B., Fischer A., Gödde T., Müller W., 1999: Clinical diagnosis of canine tick-borne encephalitis (TBE): Contribution of cerebrospinal fluid analysis (CSF) and CSF antibody titers, *Zbl. Bakt.*, 289, 605-609
- Rey F. A., Heinz F. X., Mandl C., Kunz C., Harrison S. C., 1995: The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution, *Nature*, 375, 291-298
- Rieger M. A., Nübling M., Kaiser R., Tiller F. W., Hofmann F., 1998: FSME-Infektionen durch Rohmilch – welche Rolle spielt dieser Infektionsweg? Untersuchungen aus dem südwestdeutschen FSME-Endemiegebiet, *Gesundheitswesen*, 60, 348-356
- Rodriguez-Garcia R., 2001: The health-development link: travel as a public health issue, *J. Community Health*, 26, 93-112
- Rolle M., Mayr A., 2002: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7. Auflage, Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag
- Rosa R., Pugliese A., Norman R., Hudson P. J., 2003: Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation, *J. Theor. Biol.*, 224, 359-376

- Roush J. K., Manley P. A., Dueland R. T., 1989: Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs, J. Am. Vet. Med. Assoc., 195, 951-953
- Russel C., Johnson P. D., Fred W., Hyde B. S., Cathrine M. Rumpel B. S., 1984: Taxonomy of the Lyme Disease Spirochetes, The Yale Journal of Biology and Medicine, 57, 529- 537
- Salyers A. A., Whitt D., 2002: Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach, 2. Auflage, Washington, ASM Press (American Society for Microbiology)
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989: Molecular Cloning; A laboratory manual, 2. Auflage, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F., Nickler S., Coulson A. R., 1977: DNA sequencing with chain- terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463- 5467
- Schlund W., Scharfe F., 1993: Säugetiere der Müssen bei Oberreichenbach, Naturschutz Landschaftspflege Baden-Württemberg, 27, 493- 506
- Schmidt R., Kabatzki J., Hartung S., Ackermann R., 1985: Erythema- migrans- Borreliose in der Bundesrepublik Deutschland. Epidemiologie und klinisches Bild, DMW, 110, 1803- 1807
- Schwaiger M., Cassinotti P., 2003: Development of a quantitative real- time RT- PCR assay with internal control for the laboratory detection of TBEV RNA., J. Clin. Virol. 27, 136- 145
- Schwan T. G., 1996: Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen- arthropod interactions, Infect. Agents Dis., 5, 167- 181
- Schwanda M., Oertli S., Frauchiger B., Krause M., 2000: Die Frühsommer- Meningoenzephalitis im Kanton Thurgau: eine klinisch- epidemiologische Analyse, Schweiz. Med. Wochenschr., 130, 1447- 1455
- Shapiro E. D., Gerber M. A., 2000: Lyme disease, Clin. Infect. Dis., 31, 533- 542
- Shih C. M., Pollack R. J., Telford S. R., Spielman A., 1992: Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice, J. Infect. Dis., 166, 827- 831
- Silva de A. M., Fish D., Burkot T. R., Zhang Y., Fikrig E., 1997: OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks, Infect. Immun., 65, 3146- 3150
- Sixl W., Batikova M., Stünzner D., Sekeyova M., Sixl- Voigt B., Grěsiková M., 1973: Haemagglutination- inhibiting antibodies against arboviruses in animal sera,

- collected in some regions in Austria, Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A, 224, 303-308
- Skarpaas T., Sondag A., Bruu A. L., Vene S., Pedersen J., Eng P. G., Csango P. A., et al., 2002: Tick- borne encephalitis in Norway (in Norwegian), Tidsskr. Nor. Loegeforen, 122, 30- 32
- Smith C. E. G., 1956: A virus resembling russian spring-summer encephalitis virus from an ixodid tick in Malaya, Nature, 178, 4533
- Spielman A., Pollack R. J., Kiszewski A. E., Telford S. R., 2001: Issues in public health entomology, Vector Borne Zoonotic Dis., 1, 3- 19
- Stanek G., Satz N., Strle F., Wilske B., 1993: Epidemiology of Lyme borreliosis, In: Weber K., Burgdorfer W. H. (eds): Aspects of Lyme borelliosis, Berlin Heidelberg, New York; Springer Verlag, 358- 370
- Stanek G., 1997: Biology of *Borrelia burgdorferi*; Risk of infection of Lyme Borreliosis, In: Tick- borne Encephalitis and Lyme Borreliosis, 4th International Potsdam Symposium on Tick- Borne Disease, Süss J & Kahl O., Lengerich, Pabst Science Publishers, 230- 237
- Steele G. M., Randolph S. E., 1985: An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick *Ixodes ricinus*, A unimodal season activity pattern, Bulletin of Entomolo. Res., 75, 489- 499
- Steere A. C., Bartenhagen N. H., Craft J. E., Hutchinson G. J., Newman J. H., Pachner A. R., Rahn D. W., Sigal L. H., Taylor E., Malawista S. E., 1986: Clinical manifestations of Lyme disease, Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. A, 263, 201- 205
- Steere A. C., 1989: Lyme disease, N. Engl. J. Med., 321, 586- 596
- Steere A. C., 2001: Lyme disease, N. Engl. J. Med., 345, 115- 125
- Stiasny K., Koessl C.; Heinz F. X., 2003: Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism, J. Virol., 77, 7856- 7862
- Stickel L. F., 1948: The trap line as a measure of small mammal populations, Journal of Wildlife Management, 12, 153- 161
- Stryer L., 1996: Biochemie, 4. Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Verlag
- Süss J., Schrader C., Abel U., Voigt W. P., Schosser Rudolf, 1999: Annual and seasonal variation of tick- borne encephalitis Virus (TBEV) prevalence in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT- PCR: Results from 1997 and 1998, Zent. bl. Bakteriol, 289, 564- 578

- Süss J., Schrader C., Abel U., Bormane A., Duks A., Kalnina V., 2002: Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997- 2000), *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 34- 42
- Süss J., 2003: Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines, *Vaccine*, 21, 19- 35
- Takashima I., Morita K., Chiba M., Hayasaka D., Sato T., Takezawa C., Igarashi A., Kariwa H., Yoshimatsu K., Arikawa J., Hashimoto N., 1997: A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the the Virus, *J. Clin. Microbiol.* 35, 1943-1947
- Takeda T., Ito T., Osada M., Takahashi K., Takashima I., 1999: Isolation of tick-borne encephalitis virus from wild rodents and a seroepizootiologic survey in Hokkaido, *J. Trop. Med. Hyg.*, 60, 287- 291
- Takegami T., Sakamuro D., Furukawa T., 1994: Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS3 has RNA binding and ATPase activities, *Virus Genes*, 9, 105- 112
- Tipold A., Fatzer R., Holzmann H., 1993: Zentraleuropäische Zeckenzephalitis beim Hund, *Kleintierpraxis* 38, 619- 628
- Tipold A., 2000: In: Kraft W., Hirschberger J.: *Kleintierkrankheiten*, Band I: Innere Medizin, 3. Auflage, Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, 700- 701
- Vostal K., Žakovká A., 2003: Two- year study of examination of blood from wild rodents for the presence of antiborrelial antibodies, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 10, 203- 206
- Waldvogel A., Matile H., Wegmann C., Wyler R., Kunz C., 1981: Zeckenzephalitis beim Pferd, *Schweiz Arch. Tierheilkd.*, 123, 227- 233
- Wallner G., Mandl C. W., Kunz C., Heinz F. X., 1995: The flavivirus 3'- noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis Virus, *Virology* 213, 169-178
- Wang G., van Dam A. P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J., 1997: Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. Nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 926- 932
- Wasmoen T. L., Sebrig R. W., Blumer B. M., Chavez L. G. Jr., Chu H. J., Acree W. M., 1992: Examination of Koch's postulates for *Borrelia burgdorferi* as the causative agent of limb/ joint dysfunction in dogs with borreliosis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 201, 412- 418

- Weissenböck H., Suchy A., Holzmann H., 1998: Tick- borne encephalitis in dogs: neuropathological findings and distribution of antigen, *Acta Neuropathol.*, 95, 361- 366
- Wengler G., Wengler G., 1989: Cell- associated West Nile Flavivirus is covered with E and Pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release, *J. Virol.*, 63, 2521- 2526
- Wilke M., Eiffert H., Christen H.- J., Hanefeld F., 2000: Primarily chronic and cerebrovascular course of Lyme neuroborreliosis: case reports and literature review, *Arch. Dis. Child*, 83, 67- 71
- Wilske B., Steinhuber R., Bergmeister H., Fingerle V., Schierz G., Preac- Mursic V., Vanek E., Lorbeer B., 1987: Lyme- Borreliose in Süddeutschland. Epidemiologische Daten zum Auftreten von Erkrankungsfällen sowie Durchseuchung von Zecken (*Ixodes ricinus*) mit *Borrelia burgdorferi*, *DMW*, 112, 1730- 1736
- Wilske B., 2001, auf CD-ROM: Wilke B., Fingerle V., Herzer P., Pfister H.- W., Pohl- Koppe A., Weber K., Lyme- Borreliose, Version 1.0, Grenzach- Wyhlen, Hoffmann- La Roche AG, CASUS ® by INSTRUCT AG
- Wilske B., 2002: Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis; *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 114- 119
- Whitby J. E., Whitby S. N., Jennings A. D., Stephenson J. R., Barrett A. D. J., 1993a: Nucleotide sequence of the envelope protein of a Turkish isolate of tick- borne encephalitis (TBE) virus is distinct from other viruses of the TBE virus complex. *J. Gen. Virol.* 74, 921-4
- Whitby J. E., Jennings A. D., Stephenson J. R., Barrett A. D. T., 1993b: Sequence of the envelope protein gene of the tick-borne flavivirus, Kumlinge A52, *Virus Genes.* 7, 145-9
- Xu Y., Kodner C., Coleman L., Johnson R. C., 1996: Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31, *Infect. Immun.*, 64, 3870- 3876
- Yamshchikov V. F., Pletnev A. G., 1988: Nucleotide sequence of the genome region encoding the structural proteins and the NS1 protein of the tick borne encephalitis Virus, *Nucleic Acids Res.* 16, 7750

- Zhang J. R., Hardham J. M., Barbour A. G., Norris S. J., 1997: Antigenic variation in Lyme disease borreliae by proiscuous recombination of VMP- like sequence cassettes, *Cell*, 89, 275- 285
- Zumstein G., Fuchs R., Hofmann A. ,Preac-Mursic V., Soutschek E., 1992: Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*, *Med Microbiol Immunol* 181, 57- 80

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verbreitungsgebiete von <i>Ixodes ricinus</i> und <i>Ixodes persulcatus</i> .	3
Abbildung 2	Verbreitungsgebiete von FSMEV.	5
Abbildung 3 A	Entwicklungsstufen von <i>Ixodes ricinus</i> .	8
Abbildung 3 B	Saugwerkzeug einer Zecke.	8
Abbildung 4	Lebenszyklus von <i>Ixodes ricinus</i> .	10
Abbildung 5 A	Borrelie im Dunkelfeldmikroskop.	15
Abbildung 5 B	Querschnitt durch eine Borrelie.	15
Abbildung 6	Übersicht über die Serogruppe der TBE-Viren.	24
Abbildung 7	Genomaufbau des FSMEV.	25
Abbildung 8 A	Schematische Morphologie eines unreifen und reifen FSME-Virus.	28
Abbildung 8 B	Bändermodell des E-Proteins.	28
Abbildung 9	Darstellung der Fanggebiete auf einer FSME Risikogebietskarte Bayerns.	34
Abbildung 10 A	Sherman-Lebendfalle.	35
Abbildung 10 B	Überprüfen der Köderbecher und ersetzen der markierten Becher durch Sherman Lebendfallen.	35
Abbildung 11 A	Zeckenfang mit Leintüchern in München, Englischer Garten.	36
Abbildung 11 B	Absammeln der gefangenen Zecken vom Leintuch.	36
Abbildung 12	Schematische Darstellung der Lage der Primer für die OspA-Gen spezifische 1. und 2. (nested) PCR.	41
Abbildung 13	Schema des Polyproteins von FSMEV und Lage der neu etablierten Primer für die E-Gen spezifische 1. und 2. (nested) PCR.	44
Abbildung 14	Lage der für das Cytochrom b Gen mRNA spezifischen Primer der internen Kontrolle.	48
Abbildung 15	Lage der für die 16S RNS von Zecken spezifischen Primer, der internen Kontroll-RT-PCR.	50
Abbildung 16 A	Graphische Darstellung der Verteilung der gesammelten Zecken in den vier untersuchten	55

	Gebieten.	
Abbildung 16 B	Graphische Darstellung der Verteilung der insgesamt gesammelten Zecken.	56
Abbildung 17	Artenzusammensetzung in den Fanggebieten Traunstein, Grafrath und Erlangen.	58
Abbildung 18A	Schweinenierenzelllinie.	59
Abbildung 18B	Schweinenierenzelllinie mit Langat-Virus infiziert.	59
Abbildung 19	Etablierung der E-Gen spezifischen Pan-RT-nested PCR.	60
Abbildung 20	Nachweisgrenze der neu etablierten Hüllgen-RT-PCR.	61
Abbildung 21	Nachweisgrenze der neu etablierten Hüllgen-RT-PCR bei mit Langat-Virus gespickten Mausorganen.	62
Abbildung 22 A	Etablierung und Optimierung der internen Kontroll-PCR, spezifisch für die 16S RNS von Zecken (0 mM MgCl ₂).	63
Abbildung 22 B	Etablierung und Optimierung der internen Kontroll-PCR, spezifisch für die 16S RNS von Zecken (3 mM MgCl ₂).	63
Abbildung 23	Beispiel eines Ergebnisses der 16S RNS Zecken RT-PCR.	64
Abbildung 24	Exemplarische Darstellung des Probenscreenings der Milzen auf FSMEV.	65
Abbildung 25	Beispiel eines Ergebnisses der Cytochrom b mRNS RT-PCR bei Rötel- und Feldmausproben.	66
Abbildung 26	Etablierung der OspA Gen spezifischen nested PCR.	67
Abbildung 27	Bestimmung der Spezifität der OspA-Gen spezifischen PCR.	68
Abbildung 28	Nachweisgrenze der Borrelien spezifischen nested PCR bei gespickte Ohren von Balb-c Mäusen.	68
Abbildung 29	Abhängigkeit des Gonadengewichts zur Häufigkeit der Borrelien-Infektion bei männlichen Gelbhals- und Rötelmäusen.	73
Abbildung 30	Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und Gewicht.	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31	Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und Kopf-Rumpf-Länge.	76
Abbildung 32	Abhängigkeit von Borrelien-Infektion und BMI.	78
Abbildung 33A, B	Exemplarische Darstellung zweier Mäuse mit Zeckenbefall.	80
Abbildung 34	Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Nukleotidebene.	84
Abbildung 35	Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Aminosäureebene.	85
Abbildung A 1	Übersichtskarte Mausfanggebiete Raum Erlangen.	134
Abbildung A 2	Karte Mausfanggebiet Diethenhofen (Waldgebiet).	134
Abbildung A 3	Karte Mausfanggebiet Frauenaarach (Waldgebiet).	135
Abbildung A 4	Karte Mausfanggebiet Kernmühle (Waldstück im Wasserschutzgebiet).	135
Abbildung A 5	Übersichtskarte Mausfanggebiete Raum Traunstein.	136
Abbildung A 6	Karte Mausfanggebiet Bürgerwald und Geißing.	136
Abbildung A 7	Karte Mausfanggebiete Wiese und Burkhartsöd.	137
Abbildung A 8	Übersichtskarte Maus-/ Zeckenfanggebiete München und Grafrath.	138
Abbildung A 9	Karte Mausfanggebiet Forstgarten, Grafrath (Außenstelle des Institutes für Tierökologie der TU München).	138
Abbildung A 10	Zeckenfanggebiete in Schöngeising (Lkr. Fürstfeldbruck) sowie in Münchner Parkanlagen.	139

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Taxonomie einiger als Reservoirwirt in Europa bedeutsamer Mausarten.	12
Tabelle 2	Übersicht über die Familien der Ordnung der Spirochaetales.	13
Tabelle 3	Genospezies von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l..	14
Tabelle 4	Klinische Manifestationen der Lyme-Borreliose beim Menschen.	21
Tabelle 5	Charakteristische Vertreter der Flaviviren.	23
Tabelle 6	Klinische Manifestationen einer FSMEV-Infektion.	30
Tabelle 7	Prinzip der Primerentwicklung (hier Hue1_3') an einigen Beispielsequenzen.	41
Tabelle 8	Übersicht über die in der PCR zum Nachweis von Borrelien-spezifischen Nukleinsäuren verwendeten Primer.	42
Tabelle 9	Für die Ermittlung der Sensitivität und Spezifität der OspA Gen-spezifischen nested PCR verwendete Borrelien-Stämme.	43
Tabelle 10	Prinzip der Primerentwicklung (hier TBE_ENV1A_ red) an einigen Beispielsequenzen.	45
Tabelle 11	Übersicht über die für die E-Protein-Gen-PCR verwendeten Primer.	45
Tabelle 12	Übersicht über die für die internen Kontroll-PCRs (Gehirn- und Milzproben) der Mäuse verwendeten Primer.	49
Tabelle 13	Übersicht über die für die interne Kontroll-PCR der Zeckenproben verwendeten Primer.	50
Tabelle 14	<i>I. ricinus</i> , gefangen in drei Parkanlagen Münchens.	55
Tabelle 15	Darstellung der insgesamt gefangenen Mäuse.	57
Tabelle 16	Darstellung der Ergebnisse des Probenscreenings der Milz- und Hirnproben auf FSMEV-spezifische Nukleinsäuren.	65
Tabelle 17	Darstellung der Ergebnisse des Probenscreenings auf Borrelien-spezifische Nukleinsäuren.	69
Tabelle 18	Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten Gelbhals- und Rötelmäuse.	70

Tabelle 19	Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten Gelbhals- und Rötelmäuse in den Fangorten Erlangen, Grafrath und Traunstein, sowie die ermittelte Prävalenz für die einzelnen Fangorte.	70
Tabelle 20	Anzahl der Borrelien negativ beziehungsweise positiv getesteten weiblichen und männlichen Gelbhals- und Rötelmäuse, sowie die für das entsprechende Geschlecht ermittelte Prävalenz.	71
Tabelle 21	Anzahl der Borrelien negativ und positiv getesteten trächtigen/ nicht trächtigen weiblichen Gelbhals- und Rötelmäuse, sowie die ermittelte Prävalenz.	72
Tabelle 22	Anzahl der mit Zecken befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.	80
Tabelle 23	Anzahl der mit Zecken befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.	81
Tabelle 24	Anzahl der mit Zecken befallenen, Borrelien negativen beziehungsweise positiven Mäuse.	81
Tabelle 25	Anzahl der in den drei Fangorten ermittelten Genotypen.	83
Tabelle 26	Erläuterung der in Tabelle 27 verwendeten Zahlen (1-46), die als Platzhalter für den tatsächlichen Sequenznamen eingesetzt wurden.	86
Tabelle 27	Übereinstimmung der für die Erstellung der phylogenetischen Analysen verwendeten Sequenzen (in Prozent).	87
Tabelle 28	Referenzen über die Organauswahl zur Detektion von FSMEV.	129
Tabelle 29	Übersicht über die in die Entwicklung der neuen E-Protein Gen spezifischen Primer einbezogenen FSME-Virusstämme verschiedenen geographischen Ursprunges.	129-130
Tabelle 30	Für die Erstellung der Phylogenie verwendete Sequenzen.	131- 132
Tabelle 31	Für die Erstellung der Phylogenie verwendete Referenzsequenzen.	133

10 Anhang

10.1. Materialliste

10.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

CCD-Kamera (peqLab, Erlangen)

Einmalspritze, 1 ml Ominifix[®]-F (Braun, Melsungen)

Gelelektrophoresekammer, „perfect Blue Tm“, 23 x 14 Mini ExW, (peqLab, Erlangen)

Glaspistill

Handschuhe Multi-Perect Latex Handschuhe (Multi-Com Goods, Ahrenburg);

TouchNTuff™ (Nitrilhandschuhe, Ansell Edmont, Cochocton, Ohio, USA)

Kryoröhrchen Cryo Tube™, 2 ml (Nunc, Wiesbaden)

Kühlzentrifuge Hearaeus (Heareus, Hanau)

Laborwaage 1264 (Sartorius, Göttingen)

Lichtmikroskop, Laborlux K (Leitz, Wetzlar)

24-Lochplatte (Nunc, Wiesbaden)

96-Lochplatte (Nunc, Wiesbaden)

Magnetrührer MR 2000 (Heidolph)

Messpipetten aus Glas, 1 ml, 5 ml, 10 ml, Silberbrand Eterna Klasse B (Brand, Wertheim)

Mikrowellengerät SS-758 (Panasonic, Matsushita Electric, Great Britain)

Mikro Tubes, 1,5 ml, 39 x 10,8 mm Ø (Sarstedt, Nümbrecht)

Nadel, Termo[®] Neolus 20G, 0,9 mm (Termo Europe N. V., Leuven, Belgien)

Parafil M (CAN Company, USA)

Pinzette, fein (Rubis, Schweiz)

Pipetten: *Research*, 0,1- 2,5 µl; 0,5- 10 µl; 100- 1000 µl (Eppendorf, Köln)

Pipettenspitzen, Plastibrand[®] (Brand, Wertheim)

Pipettenspitzen mit Filter, Biospere Filter Tips (Sarstedt, Nümbrecht)

Pipettierhilfe, *Accu-Jet*[®] (Brand, Wertheim)

Power-Supply Power Pac 300 (BioRad, USA)

Sicherheitswerkbank, Hera safe 12 (Kendro, Hanau)

Stahlkugeln 4,5 mm, Premium Grade BB (Ernst Bloomfield, New York; Vertr. Frankonia Jagd, München)

Sherman Lebendfallen (zur Verfügung gestellt von Prof. W. Bäumler TU München)

Thermocycler „Primus 96 advanced Gradient“ (peqLab, Erlangen)

Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)

Thermosprintplatte, 96-Loch (Bilatec, Mannheim)

Tissue-Tücher (Roth, Karlsruhe)

UV-Transilluminator 302 nm (LTF, Wasserburg)

Mixermill-Gerät, MM 300 (Retsch®, Haan)

Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm² (Nunc, Wiesbaden)

10.1.2. Enzyme, Zellen

PK₁₅-Zellen (RIE 5- 1; Schweinenierenzellen ab 49. Passage)

Proteinase K (Qiagen, Hilden)

RAV-2 (Reverse Transkriptase) 28 U/ µl (Amersham, Buckinghamshire, England)

RNAasin 40 U/ µl (Promega, Madison, USA)

Taq-Polymerase, 5 U/ µl (peqLab, Erlangen)

10.1.3. Kommerzielle Kits

Rneasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden)

QiaAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

10.1.4. Chemikalien

Agarose, peq Gold Universal (peqLab, Erlangen)

Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe)

DEPC (Fulka, Neu-Ulm)

DNA-Marker (für Gelelektrophorese), 100 kb/ 1 kb (BioLabs, Beverly, USA)

DMEM (Dulbeccos MEM, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃) (Biochrom, Berlin)

DMSO (Sigma, Deisenhofen)

dNTP-Mix, 2,5 mM (peqLab, Erlangen)

Ethanol (Roth, Karlsruhe)

Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)

FKS (fetales Kälberserum; Biochrom, Berlin)

Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

Magnesiumchlorid für PCR-Ansätze, 25 mM (peqLab, Erlangen)

Magnesiumchlorid für Puffer (Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenkarbonat (Merck, Darmstadt)
NEA (*Nonessential Amino Acids*, Biochrom, Berlin)
Penicillin (1 Mega Grünenthal, Grünenthal, Aachen)
Phenolrot (0,1%) (Merck, Darmstadt)
10x Reaktionspuffer S/ Y für PCR-Ansätze (peqLab, Erlangen)
D(+)-Saccharose (Sucrose) (Roth, Karlsruhe)
Streptomycin (Strepto-Hefa, PHARMA, Wernigerode)
Tris (Roth, Karlsruhe)

10.1.5. Puffer und Lösungen (Rezepte aus Sambrook & Maniatis, 1989)

Agarosegele	gewünschte % Agarose (w/v) in 1x TAE-Puffer
DEPC-Aqua	0,1 % DEPC in Aqua dest., autoklaviert
Ethidiumbromidbad 1 ‰	Ethidiumbromid (w/v) in Aqua dest.
DNA-Marker- Lsg.	100 µl DNA-Marker 100 µl 6x Ladepuffer 1:50 verdünnt 400 µl Aqua bidest.
6x Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau 40 % (w/v) D(+)-Saccharose (Sucrose) in Aqua bidest.

PBS (*phosphate buffered saline*)

	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	2,37 g Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	0,132 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	0,1 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	ad 1 l Aqua denim., pH 7,4
PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	wie PBS, lediglich ohne CaCl ₂ und MgCl ₂
Saline (10-fach)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O

	0,2 g KH_2PO_4
	1 g Glucose
	10 ml Phenolrot (0,1 %)
	ad 1 l Aqua bidest.
STV-Lösung	200 ml Saline (10-fach)
	100 ml Trypsin (1,25%ig)
	50 ml Versen
	ca. 12 ml NaHCO_3 (8,8%ig)
	ad 2 l Aqua bidest., pH 7,4
50x TAE-Puffer	242 g Tris
	57,1 ml Eisessig
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	ad 1 l Aqua bidest

10.2. Tabellen**Tab. 28: Referenzen über die Organauswahl zur Detektion von FSMEV**

n.b.= nicht bekannt; i.c.= intra cutan; NT= Neutralisationstest; s.c.= subcutan.

ORGAN	METHODE	Tierart	FANGZEIT- RAUM	ANZAHL TIERE	ERGEBNIS	Referenz
Milz	BHK, NT	<i>Apod. Sp.</i> , <i>Clethr. Sp.</i> , <i>Apod. Arg.</i>	1992-1997	169	1995:15,8% 1996: 11%	Takeda et al., 1999
Lunge, Leber, Gehirn	NT, i.c. inokulation in Mäuse	<i>A. flavic</i> , <i>A. sylv.</i> , <i>C. glareolus</i> , <i>M. arvalis</i>	1990-1992	923	1990: 12,5% 1991: 16,6% 1992: 23,5%	Kozuch et al., 1995
Gehirn, Lunge-Milz pool	n.b.	Verschied. Mausarten	1981-1986	2922		Kozuch et al., 1990
Gehirn	RT-PCR	Labormäuse (s.c. Inf.)		90		Moshkin et al., 2002

Tab. 29: Übersicht über die in die Entwicklung der neuen E-Protein Gen spezifischen Primer einbezogenen FSME-Virusstämme verschiedenen geographischen Ursprunges; 1= Ecker et al., 1999; 2= Mandl et al., 1988; 3= Wallner et al., 1995; 4= Whitby et al., 1993a; 5=Whitby et al., 1993b; 6=Takashima et al., 1997; 7= Hayasaka et al., 1999; 8= Hayasaka et al., 2001; 9= Zlobin et al., unpubl.; 10= Campbell & Pletnev, 2000; 11= Platonov et al., unpubl.; 12= Gritsun et al., 1993; 13= Yamshchikov & Pletnev, 1988; 14= Chen et al., unpubl.; 15= Mickiené et al., 2001; 16= Lundkvist et al., 2001; 17= Si, Ma & Li, unpubl.; 18= Labuda et al., 1994; n.b.= nicht bekannt.

Stamm	Geograph. Herkunft	Jahr der Isolation	Quelle des Isolates	Genbank- Nummer	Referenz
K23	Deutschland/ Karlsruhe	1975	<i>I. ricinus</i>	AF091010	1
Iso 40	Schweiz/ Schaffhausen	1975	<i>I. ricinus</i>	AF091009	1
Neud	Österreich/ Neudörfel	1971	<i>I. ricinus</i>	M27157	2
ZZ9	Österreich/ Zell/Ziller	1985	<i>I. ricinus</i>	AF091020	1
Scharl	Österreich	1956	Gehirn, human	AF091017	1
Als.I	Frankreich/ Alsace	1975	<i>I. ricinus</i>	AF091007	1
263	Tsch. Republik/ Temelin	1987	<i>I. ricinus</i>	U27491	3
Hypr.	Tsch. Republik/ Brno	1953	Blut, human	U39292	3
Kem I	Ungarn/ Tatabanya	1952	<i>I. ricinus</i>	AF091011	1
Ljub.I	Slovenien/ Ljubiljana	1993	Blut, human	AF091012	1
St. Ves	Kroatien/ Stara Ves	n.b.	N.b.	AF091018	1
A52	Finnland/ Kumlinge	1959	<i>I. ricinus</i>	X60286	5
Oshima 5-10	Japan	n.b.	n.b.	AB001026	6
Oshima 5-11	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022290	7
Oshima 3-6	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022291	7
O-I-1	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022292	7

Fortsetzung	Tabelle 29					
Oshima A-1	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022293	7	
Oshima C-1	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022294	7	
KH98-2	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022295	7	
KH98-5	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022296	7	
KH98-10	Japan/ Russland	n.b.	n.b.	AB022297	7	
VL99 m11	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049345	8	
KH99 m9	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049346	8	
D1283	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049347	8	
IR99-1m1	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049348	8	
IR99-1m4	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049349	8	
IR99-2m3	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049350	8	
IR99-2m7	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049351	8	
IR99-2f7	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049352	8	
IR99-2f13	Russland/ Sibirien	n.b.	n.b.	AB049353	8	
Semeks	Ukraine/ Zhitomir	1988	<i>I. ricinus</i>	AF224665	9	
Stolby-1	Russland/ Krasnoyarsk	1988	<i>I. persulcatus</i>	AF224666	9	
352-81	Russland/ Buryatia	1981	<i>Cricetulus barabensis</i>	AF224667	9	
Stolby-4	Russland/ Krasnoyarsk	1988	<i>Ixodes persulcatus</i>	AF231807	9	
Atten. E5	n.b.	n.b.	n.b.	AF253420	10	
B-29/10140	Russland/ Novosibirsk	1991	<i>Ondatra zibethicus</i>	AF482346	11	
B-30/10146	Russland/ Novosibirsk	1991	<i>Ondatra zibethicus</i>	AF482347	11	
Vasilchenko	Russland/ Novosibirsk	n.b.	n.b.	M97659	12	
N256	Belarus/ Minsk	n.b.	<i>I. ricinus</i>	AF091014	1	
Crimea	Ukraine/ Crimea	1987	<i>I. ricinus</i>	AF091008	1	
Absettarov	Russland/ St. Petersburg	1951	Blut, human	AF091005	1	
Pan	Russland/ Moskau	1957	Blut, human	AF091015	1	
T-blood	Russland/ Perm	1939	Blut, human	AF091019	1	
Aina	Russland/ Irkutsk	1963	Blut, human	AF091006	1	
Sofjin	Russland/ Primorskii Kray	1937	Gehirn, human	X07755	13	
N132	Russland	1979	<i>I. persulcatus</i>	AF091013	1	
DXAL5	China	n.b.	n.b.	AJ178833	14	
Lithuania-262	Lithuania	n.b.	n.b.	AJ414703	15	
Latvia-11686	Latvia	n.b.	Maus	AJ319582	16	
Latvia-8110	Latvia	n.b.	Maus	AJ319583	16	
Latvia-8369	Latvia	n.b.	Maus	AJ319584	16	
Latvia-9793	Latvia	n.b.	Maus	AJ319585	16	
Latvia1-96	Latvia	n.b.	Maus	AJ415565	16	
Latvia-12718	Latvia	n.b.	Maus	AJ319586	16	
RK1424	Latvia	1977	<i>I. persulcatus</i>	AF091016	1	
Senzhang	China	n.b.	n.b.	AY174188	17	
N.b.	Türkei	n.b.	n.b.	L01265	4	
TP21	n.b.	n.b.	n.b.	NC003690	10	
TBE 4387	n.b.	n.b.	n.b.	X76607	18	
TBE 4387/B7	n.b.	n.b.	n.b.	X76608	18	

Tab. 30: Für die Erstellung der Phylogenie verwendete Sequenzen, sowie die jeweils als identisch ermittelten Sequenzen.

Sequenz	Genotyp	Mausspezies	Fangort	Fangdatum
22 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Freising	04.10.01
573	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	21.01.03
737	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
247 =	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	19.03.02
506	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	02.11.02
649	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.05.03
779	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	13.08.03
28 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Freising	08.10.01
253	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	20.04.02
301	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Grafrath	25.05.02
345	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	14.07.02
387	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	17.08.02
545	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	19.11.02
643	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	15.05.03
694	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	03.07.03
29 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Freising	09.10.01
676	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	25.06.03
786	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	26.06.03
30 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Freising	09.10.01
50	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Grafrath	23.10.01
291	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Grafrath	23.05.02
485	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	20.10.02
639	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	15.05.03
640	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	15.05.03
642	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Traunstein	15.05.03
696	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	03.07.03
648 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	27.05.03
608	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.03.03
721	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	17.07.03
615 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	20.04.03
406	<i>B. afzelii</i>	Waldmaus	Grafrath	01.09.02
609	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.03.03
661	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.05.03
680	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	26.06.03
674 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	05.06.03
676	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	25.06.03
714 =	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	17.07.03
461	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	29.09.02
602	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.03.03
825 =	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Rötelmaus	Grafrath	08.01.04
813	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Rötelmaus	Grafrath	14.12.03
815	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Rötelmaus	Grafrath	15.12.03
545 =	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	19.11.02
610	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	27.03.03
707	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	02.07.03
747	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
758	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
767	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	13.08.03
642 =	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Traunstein	15.05.03
653	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.05.03

Anhang

Fortsetzung	Tabelle 30			
670	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	05.06.03
697	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	03.07.03
701	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	03.07.03
705	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	20.06.03
729	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	22.07.03
736	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	22.07.03
645 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	15.05.03
749	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
753	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	07.08.03
674 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	05.06.03
723	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Traunstein	21.07.03
780	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	27.08.03
676 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	25.06.03
689	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	02.07.03
750	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
690 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	02.07.03
699	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	03.07.03
737 =	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Erlangen	07.08.03
755	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	07.08.03
602 =	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	27.03.03
743	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	07.08.03
242	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Gelbhalsmaus	Grafrath	22.03.02
559	<i>B. garinii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	29.11.02
563	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	02.12.02
379	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Grafrath	28.07.02
646	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Traunstein	15.05.03
Erlangen 4	<i>B. garinii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	05.03.02
620	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Grafrath	23.04.03
725	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	22.07.03
726	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	22.07.03
757	<i>B. afzelii</i>	Gelbhalsmaus	Erlangen	07.08.03
793	<i>B. afzelii</i>	Feldmaus	Traunstein	03.09.03
798	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Traunstein	04.09.03
804	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Gelbhalsmaus	Grafrath	03.12.03
814	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	15.12.03
103	<i>B. afzelii</i>	Rötelmaus	Grafrath	05.12.01

Tab. 31: Für die Erstellung der Phylogenie verwendete Referenzsequenzen (modifiziert nach Michel *et al.*, 2003).

Referenzstämme	Genotyp	OspA-Typ
AF095940	<i>B. valaisiana</i>	
AF095947	<i>B. valaisiana</i>	
AF102057	<i>Borrelia</i> A14S	
L23144	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
S48322	<i>B. afzelii</i>	2
S48323	<i>B. garinii</i>	4
X80182	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
X80251	<i>B. garinii</i>	5
X80252	<i>B. garinii</i>	6
X80254	<i>B. garinii</i>	7
X80256	<i>B. garinii</i>	3
X95362	<i>B. garinii</i>	7
Y10838	<i>B. lusitaniae</i>	
Y10839	<i>B. lusitaniae</i>	

10.3. Karten



Abb. A 1: Übersichtskarte Mausfanggebiete Raum Erlangen



Abb. A 2: Mausfanggebiet Dietenhofen (Waldgebiet)

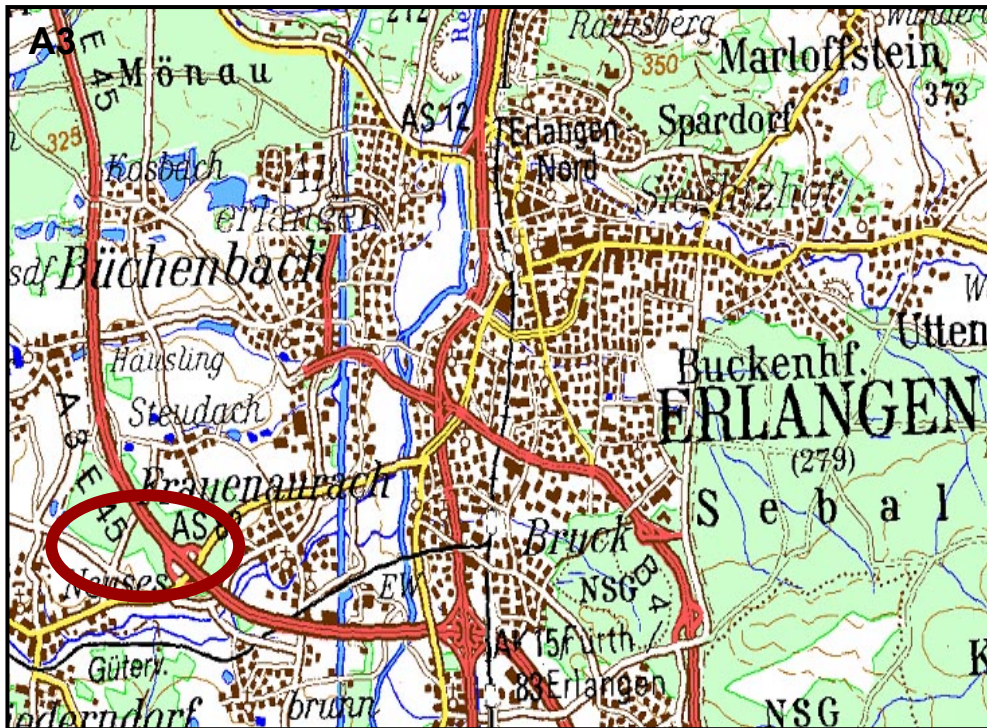


Abb. A 3: Mausfanggebiet Frauenaurach (Waldgebiet)

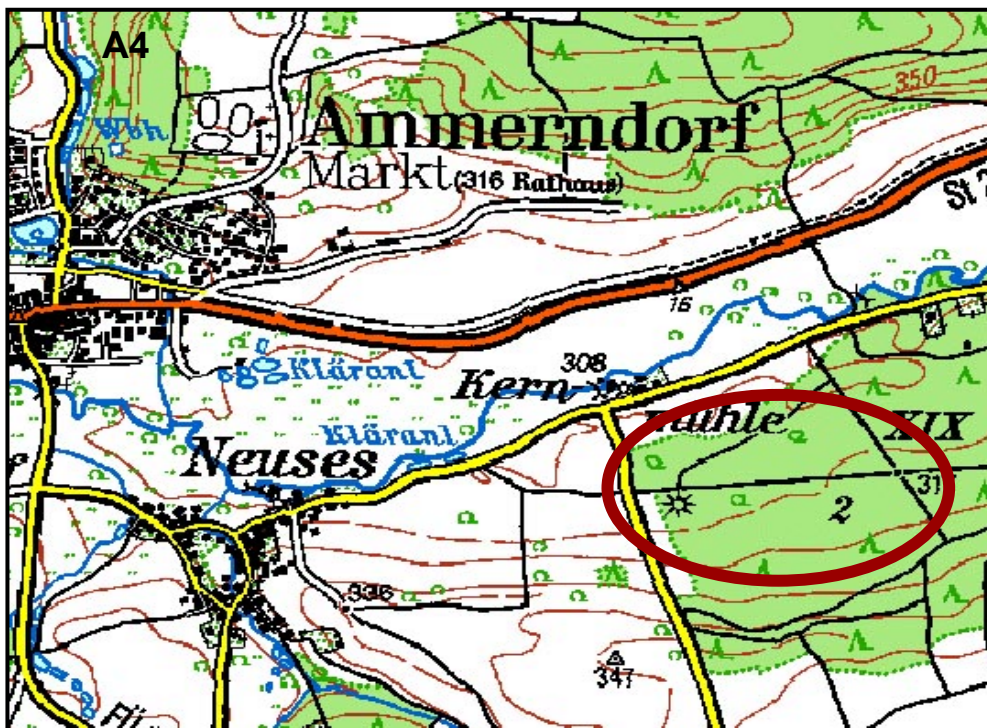


Abb. A 4: Mausfanggebiet Kernmühle (Waldstück im Wasserschutzgebiet)

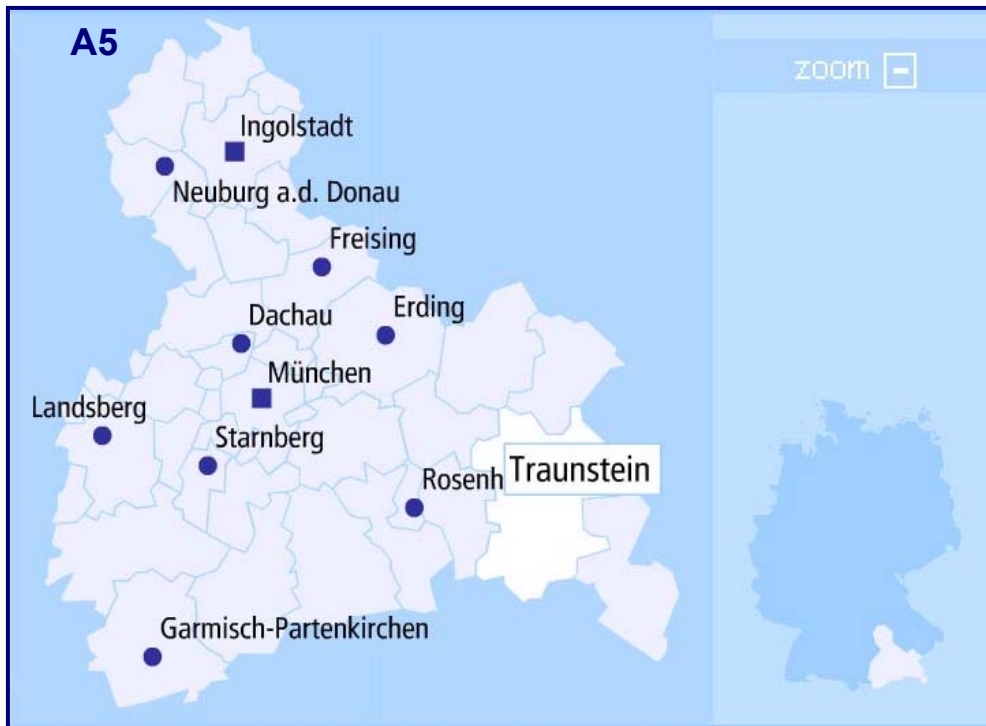


Abb. A 5: Übersichtskarte Mausfanggebiete Raum Traunstein

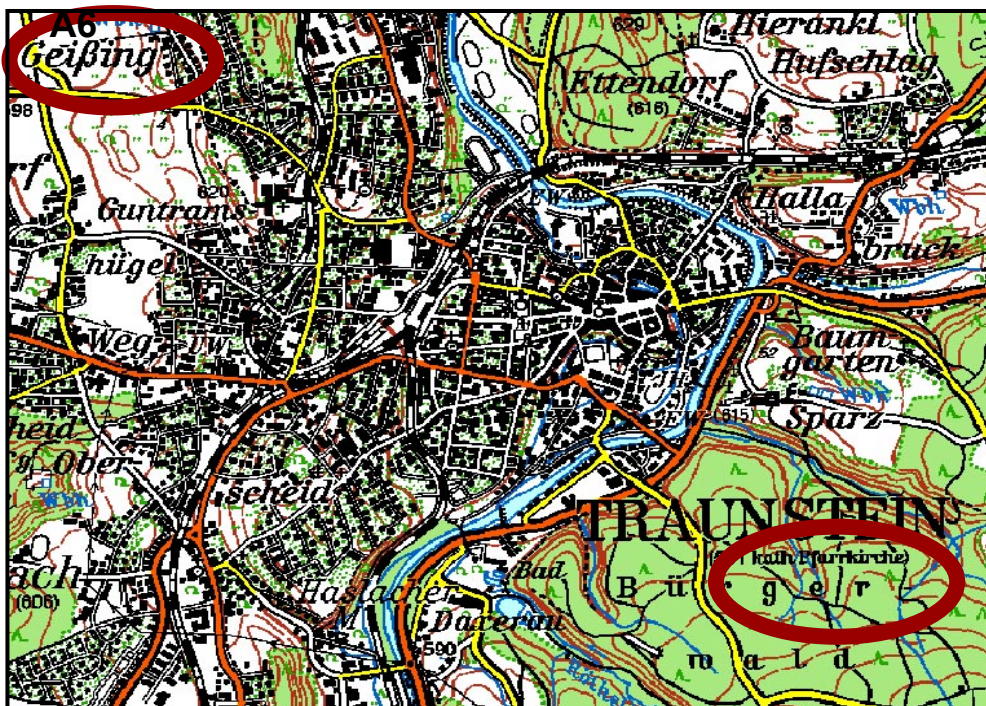


Abb. A 6: Mausfanggebiet Bürgerwald (rechts) und Geißing (links)

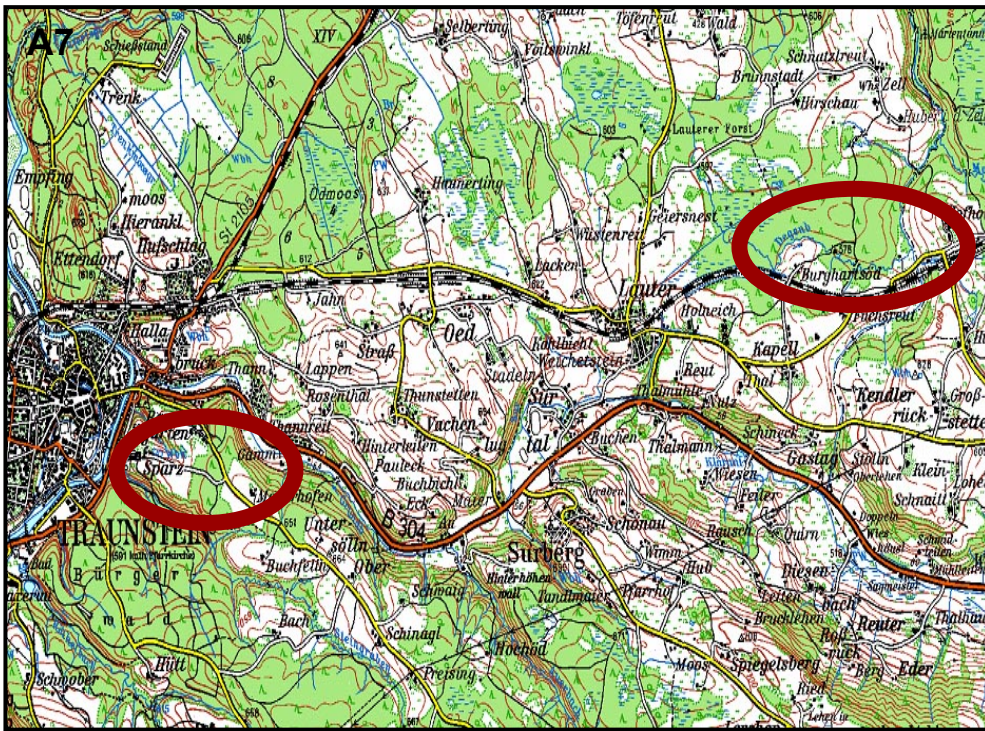


Abb. A 7: Mausfanggebiete Wiese (links) und Burkhartsöd (rechts)



Abb. A 8: Übersichtskarte Maus-/ Zeckenfanggebiete München und Grafrath

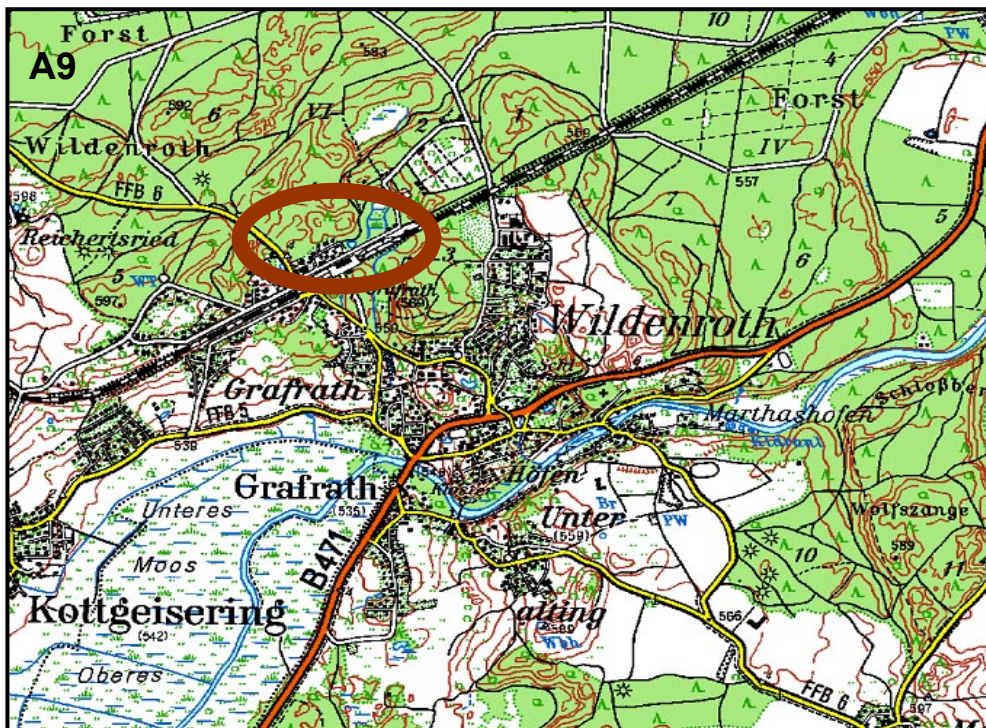
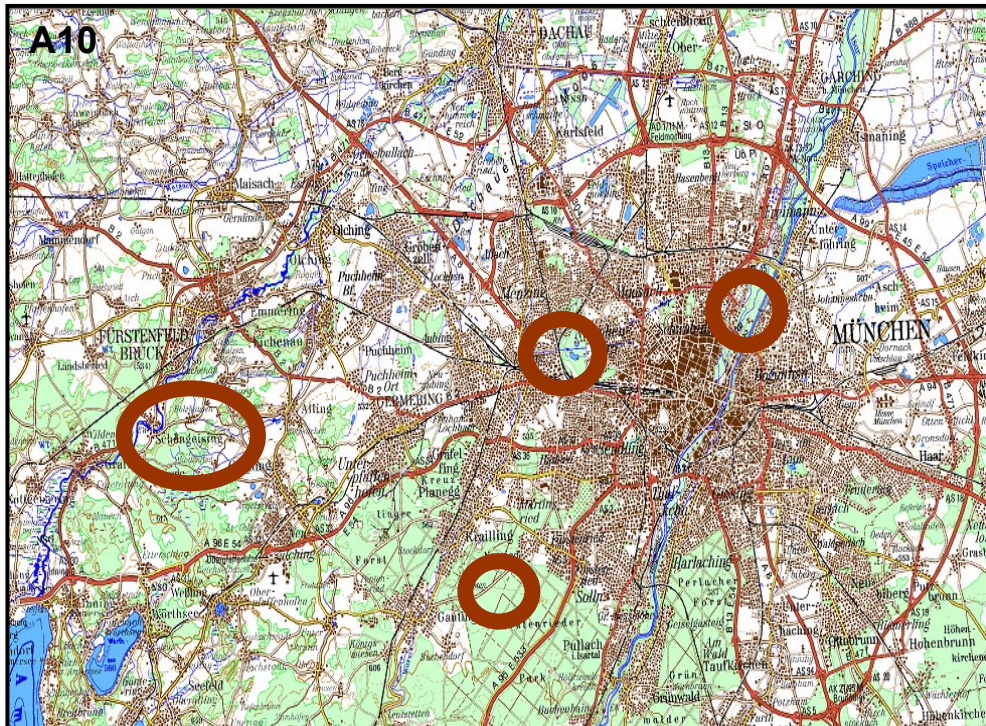


Abb. A 9: Mausfanggebiet Forstgarten, Grafrath (Außenstelle des Institutes für Tierökologie der TU München)



**Abb. A 10: Zeckenfanggebiete in Schöngeising (Lkr. Fürstenfeldbruck),
sowie in Münchner Parkanlagen**

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kaaden bedanken, der mir den Arbeitsplatz bereitstellte, mir die Wahl des Themas überließ und stets seine Unterstützung gewährte.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Dr. Sandra Essbauer angefertigt. Für die vorbildliche Betreuung und die freundschaftliche Unterstützung möchte ich mich vielmals bei ihr bedanken.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Sonja Wilhelm für die vielen guten Gespräche und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Bärbel Köttgen und Frau Gabriele Platzer bedanke ich mich für die stets freundliche Unterstützung bei labortechnischen Fragen und die gute Zusammenarbeit. Auch möchte ich mich bei Frau Grit Kermes und Frau Ilona Moosbrugger bedanken, die bei den Mäusesektionen mitgearbeitet haben.

Im Besonderen bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Bäumler, für die ausführliche Beratung in Sachen Mäusefang.

Mein Dank gilt Herrn Dr. Volker Fingerle für die guten Anregungen und die Bereitstellung der Borrelienstämme. Sowie dem LGL für die Bereitstellung des Leptospirenstammes. Ebenfalls gedankt sei Frau Dr. Ursula Stocker, Dr. Georg Wolf und Herrn Dr. Frank Just für das große Interesse an dieser Arbeit.

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt vom STMUGV und der Firma Merial.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern sowie Tatjana und Fabian die mich immer großartig unterstütz haben.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Nikolaos Tsalos, der mich mit viel Geduld, und seiner großzügigen und außergewöhnlich liebenswerten Art unterstützt hat.

Bei Frau Dr. Carmen Knebel und Frau Dr. Pia Zimmermann, die mir eine große Hilfe waren, möchte ich mich herzlich bedanken. Ebenso bei Frau Dr. Ortrun Lipp für die liebe moralische Unterstützung.