
Aus dem
Institut für Vergleichende Tropenmedizin
und Parasitologie
der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Vorstand: Prof. Dr. Kurt Pfister

Untersuchungen zur Häufigkeit von
Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma
***phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus**
Bayern und Baden-Württemberg

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

von
Sarah Leonhard
aus Wiesbaden

München 2005

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Pfister

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. H. Roos

Tag der Promotion: 15. Juli, 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung, Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Erreger	3
2.1.1	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	3
2.1.1.1	Geschichtliches	3
2.1.1.2	Systematik	3
2.1.1.3	Morphologie und Genom	4
2.1.1.4	Heterogenität von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	5
2.1.1.5	Geographische Verbreitung	5
2.1.1.6	Vektor	6
2.1.1.7	Übertragung	6
2.1.1.8	Lyme Borreliose beim Menschen	7
2.1.1.9	Borreliose beim Tier	8
2.1.2	<i>A. phagocytophilum</i>	11
2.1.2.1	Geschichtliches	11
2.1.2.2	Systematik	12
2.1.2.3	Morphologie und Eigenschaften	13
2.1.2.4	Geographische Verbreitung	13
2.1.2.5	Vektor	14
2.1.2.6	Übertragung	14
2.1.2.7	Granulozytäre Ehrlichiose Mensch	15
2.1.2.8	Granulozytäre Ehrlichiose Tier	15
2.1.3	Babesien: <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i>	17
2.1.3.1	Geschichtliches	17
2.1.3.2	Systematik	18
2.1.3.3	Morphologie, Eigenschaften	18
2.1.3.4	Geographische Verbreitung	19
2.1.3.5	Vektor	19
2.1.3.6	Übertragung und Entwicklung	20
2.1.3.7	Humane Babesiose	21
2.1.3.8	Babesiose des Rindes	21
2.2	Vektor: <i>I. ricinus</i>	22
2.2.1	Systematik und Morphologie	22
2.2.2	Geographische Verbreitung und Habitat	22
2.2.3	Wirtsfindung, Saugakt	23
2.2.4	Lebenszyklus	24

2.2.5	Jahreszeitliche Aktivität	24
2.3	Epidemiologie	25
2.3.1	<i>I. ricinus</i> : Bedeutung als Vektor	25
2.3.2	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	26
2.3.2.1	Infektionsspektrum, Wirtstiere, Reservoir	26
2.3.2.2	Prävalenzen von nüchternen <i>I. ricinus</i> mit <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	27
2.3.2.3	Prävalenz der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	29
2.3.2.4	Prävalenzen von gesaugten <i>I. ricinus</i> mit <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	30
2.3.3	<i>A. phagocytophilum</i>	31
2.3.3.1	Infektionsspektrum	31
2.3.3.2	Wirtstiere, Reservoir	32
2.3.3.3	Prävalenzen von <i>A. phagocytophilum</i> in <i>I. ricinus</i>	33
2.3.4	<i>B. divergens</i> , <i>B. microti</i>	34
2.3.4.1	Infektionsspektrum, Wirtstiere, Reservoir	34
2.3.4.2	Humane Babesiose, Epidemiologie	35
2.3.4.3	Bovine Babesiose, Epidemiologie	36
2.3.4.4	Prävalenzen von <i>B. microti</i> und <i>B. divergens</i> in <i>I. ricinus</i>	37
2.3.5	Koinfektionen	37
2.4	Nachweis und Differenzierung von Zecken übertragenen Erregern in epidemiologischen Studien	38
2.4.1	Methoden zur Detektion von Erregern in Zecken	38
2.4.2	Detektion von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	39
2.4.3	Differenzierung von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	40
2.4.4	Detektion von <i>A. phagocytophilum</i>	41
2.4.5	Detektion von <i>Babesia</i> spp.	42
3	Material und Methoden	43
3.1	Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits	43
3.2	Enzyme	43
3.3	Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	44
3.4	Nährmedien	44
3.5	Chemikalien	45
3.6	Biologisches Material	45
3.6.1	Nüchterne Zecken	45
3.6.2	Gesaugte Zecken	47
3.7	Prinzip der DNA-Extraktion	48
3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	49
3.8.1	Prinzip	49

3.8.2	Semi-nested / nested PCR	50
3.8.3	Real-Time PCR	50
3.9	Hydrolyse mit DNA-Restriktionsenzymen	53
3.10	Agarosegel-Elektrophorese	53
3.11	Nachweis von <i>Borrelia</i> spp.	54
3.11.1	Real-Time PCR zur Detektion von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	54
3.11.2	Semi-nested PCR zur Ermittlung der <i>B. burgdorferi</i> sensu lato Spezies	56
3.11.3	RFLP-Analyse zur Differenzierung von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	58
3.12	Klonierung von PCR-Produkten	60
3.12.1	Ligation des Flagellin (<i>fla</i>)- Amplifikats in den PCRII Vektor	60
3.12.2	Transformation von <i>E.coli</i>	61
3.12.3	„Screening“ PCR zur Detektion des Inserts	62
3.12.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	62
3.13	Nachweis von <i>A. phagocytophilum</i>	63
3.13.1	Real-Time PCR zur Detektion des 16Sr-RNA-Gens	63
3.13.2	Real-Time PCR zur Detektion des <i>msp2</i> -Gens	64
3.13.3	Nested PCR zur Detektion des 16Sr-RNA-Gens	66
3.14	Nachweis von <i>Babesia</i> spp.	68
3.15	Überprüfung einer Inhibition	70
3.16	Differenzierung der <i>B. burgdorferi</i> sensu lato- und <i>A. phagocytophilum</i> -Stämme durch Sequenzierung der <i>ospA</i> -Gen- bzw. der 16Sr-RNA-Gen-Amplifikate	71
3.17	Sequenzanalysen	72
3.18	Statistik	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato in <i>I. ricinus</i>	73
4.1.1	Bestimmung der Infektionsrate durch PCR-Amplifikation des <i>fla</i> -Gens	73
4.1.2	Bestimmung der Infektionsrate durch PCR-Amplifikation des <i>ospA</i> -Gens	74
4.2	Typisierung der <i>Borrelia</i> -Stämme durch RFLP-Analyse des <i>ospA</i> -Gen Amplifikats	79
4.2.1	Ergebnisse der <i>OspA</i> -Typisierung	81
4.2.2	Ergebnis der Sequenzierung	82
4.2.3	Lokale Variation der gefundenen Borrelien-Spezies	85
4.2.4	<i>OspA</i> -Subtypisierung von <i>B. garinii</i>	86
4.2.5	Mischinfektionen	88
4.3	Klonierung und Sequenzierung des <i>fla</i> -PCR-Amplifikats	90
4.4	Prävalenz von <i>A. phagocytophilum</i> in <i>I. ricinus</i>	90
4.4.1	Prävalenz in nüchternen und gesaugten Zecken	91
4.4.2	Bestätigung der Prävalenzen	95

4.4.3	Ergebnisse Sequenzierung	96
4.5	Prävalenz von <i>Babesia</i> spp. in <i>I. ricinus</i>	96
4.6	Koinfektionen	96
5	Diskussion	98
5.1	<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	98
5.1.1	Prävalenz	98
5.1.2	Verteilung der Spezies und OspA-Typen von <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	100
5.1.3	Vergleich der <i>fla</i> -Real-Time PCR und der <i>ospA</i> -PCR	102
5.2	<i>A. phagocytophilum</i>	104
5.2.1	Prävalenz	104
5.2.2	Vergleich der 16Sr-DNA- und der <i>msp2</i> -Real-Time PCR	105
5.3	<i>Babesia</i> spp.	106
5.4	Koinfektionen	107
5.5	Schlussfolgerung, Ausblick	108
6	Zusammenfassung/Summary	110
6.1	Zusammenfassung	110
6.2	Summary	112
7	Literaturverzeichnis	114
Anhang		137
	Abkürzungsverzeichnis	137
	Tabelle Prävalenzen	139
	Lebenslauf	140
	Danksagungen	141

1 Einleitung, Zielsetzung

Borrelia burgdorferi sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* und *Babesia microti* zählen zu den bedeutsamsten von Zecken übertragenen Zoonoseerregern in Deutschland. Die Bedeutung der Lyme Borreliose ist in der Humanmedizin seit langem unbestritten, beim Tier aber trotz häufig festgestellter Infektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato zum Teil noch ungeklärt. Indessen gewinnt die granulozytäre Ehrlichiose als so genannte „emerging disease“ bei Mensch und Tier gleichermaßen an Bedeutung. Letzteres trifft auch für die humane Babesiose zu, während die Babesiosen der Haustiere in der Veterinärmedizin schon lange bekannt sind, wobei sich ihr Vorkommen in Deutschland vor allem auf das Rind und zugleich auf wenige Endemiegebiete beschränkt (Zintl et al., 2003). *Ixodes ricinus* ist in Zentraleuropa der wichtigste Vektor von *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum*, *B. divergens* und *B. microti*. Für exponierte Menschen und Tiere besteht folglich ein potentiell Infektions- und Erkrankungsrisiko mit jedem der genannten Erreger (Fingerle et al., 1997; Kordick et al., 1999; Hartelt et al., 2003). Dabei können sowohl Infektionen mit einer Erregerart als auch Mischinfektionen vorkommen, woraus häufig ein unspezifisches Krankheitsbild resultiert. Eine sichere Diagnosestellung und gezielte Therapie werden dadurch entsprechend erschwert (Hunfeld et al., 1998; Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999a; Wilske und Fingerle, 2000; Hermanowska-Szpakowicz et al., 2004).

Die derzeitigen Kenntnisse über das Vorkommen dieser Erreger in Deutschland sind sehr lückenhaft und beruhen vor allem auf humanmedizinischen Seroprävalenzstudien. Da aber auch Haus- und Nutztiere an Borreliose und granulozytärer Ehrlichiose erkranken, und *B. divergens* einen wichtigen Krankheitserreger für Rinder darstellt, ist die Abschätzung der Infektionsgefahr sowohl von hoher human- als auch veterinärmedizinischer Bedeutung. Daten über die Befallshäufigkeiten des Vektors *I. ricinus* mit diesen Erregern sowie deren geographische Verbreitung sind zum Schutz der Menschen, die sich berufsbedingt oder in der Freizeit vermehrt in der Natur aufhalten, aber auch von Tieren, die häufig einem Zeckenbefall ausgesetzt sind, von unschätzbarem Wert. In Deutschland, wo der Nachweis von Antikörpern gegen Borrelien, Anaplasmen und Babesien bei Mensch und Tier häufig beschrieben wird (Fingerle et al., 1997; Hunfeld und Brade, 1999; Reimer et al., 1999; Hunfeld et al., 2002; Liebisch und Liebisch, 2003), wurden derartige Erhebungen bisher

nur punktuell durchgeführt. Vom Tier abgesammelte gesaugte Zecken, die also eine unmittelbare Infektionsgefahr darstellen, wurden bislang kaum analysiert. Die Erkenntnisse solcher Untersuchungen stellen jedoch die Voraussetzung für eine effizientere Prävention und schnellere Diagnose der entsprechenden Erreger dar. Sie können ferner für die Entwicklung und Evaluierung von diagnostischen Testsystemen und Impfstoffen bzw. -strategien bedeutsam sein.

Nachdem in derselben Vektorzecke verschiedenste apathogene oder pathogene Erreger (Protozoen, Bakterien, Rickettsien oder Viren) koexistieren können (Noda et al., 1997; Sparagano et al., 1999) werden zu ihrer Identifikation spezifische und sensitive Nachweisverfahren benötigt. Diesem Anspruch wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gerecht, mittels derer der Nachweis sehr schwacher Infektionen und zugleich eine Differenzierung von Spezies und teilweise sogar von Stämmen gelingt.

Die in Europa relevanten *B. burgdorferi* sensu lato Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* werden weiter in OspA-Typen eingeteilt. Dabei wird eine Assoziation der verschiedenen OspA-Typen mit den unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen der Lyme Borreliose vermutet (van Dam et al., 1993; Wilske et al., 1993). Auch für die OspA-Typen von *B. burgdorferi* sensu lato wurden bisher nur wenige Prävalenzdaten erhoben.

Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, nüchterne aus der Natur gesammelte *I. ricinus* Zecken aus drei verschiedenen Regionen in Bayern und gesaugte Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg, sowie einen kleineren Anteil von gesaugten Zecken von Rindern aus der Schweiz auf Infektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* und *Babesia* spp. zu untersuchen. Ferner sollte eine Differenzierung der *B. burgdorferi* sensu lato Spezies inklusive OspA-Typisierung durchgeführt werden. Zur Detektion der einzelnen Erreger wurden die Real-Time PCR bzw. die nested PCR gewählt. Letztere Methode wurde zur weiteren Bestimmung der einzelnen *B. burgdorferi* sensu lato Spezies und deren OspA-Typen in Verbindung mit einer RFLP-Analyse angewandt.

Die ermittelten Prävalenzdaten sollten hinsichtlich ihrer geographischen Herkunft sowie des Blutaufnahmestatus der Zecken und unter Berücksichtigung der Wirtstierart verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Erreger

2.1.1 *B. burgdorferi* sensu lato

2.1.1.1 Geschichtliches

„Lyme Disease“ wurde erstmals in dem Ort Lyme, Connecticut (USA) beschrieben, wo in den Jahren 1972 bis 1976 bei den Einwohnern gehäuft Fälle von Arthritiden festgestellt wurden (Steere et al., 1976). Eine saisonale und lokale Häufung dieser Krankheitserscheinung ließ eine Übertragung durch Arthropoden vermuten (Steere et al., 1977b). Aber auch in Europa wurden schon einige Jahre früher einzelne Manifestationsformen der Lyme Borreliose beschrieben, 1883 von Buchwald die ‚Acrodermatitis chronica atrophicans, 1910 eine von Afzelius beschriebene Hauterkrankung, später als Erythema chronicum migrans bekannt. Es folgten weitere Berichte neurologischer Erkrankungen, die in Folge eines Erythema chronicum migrans auftraten (Bannwarth, 1941; Hellerström, 1930).

Es dauerte fast hundert Jahre bis nach der ersten Beschreibung einer klinisch manifestierten Lyme Borreliose in Europa, Borrelien in *I. scapularis* Zecken in den USA entdeckt wurden (Burgdorfer et al., 1982). Kurz darauf konnten auch in Europa ähnliche Spirochäten in einer nahe verwandten Zeckenart, *I. ricinus*, nachgewiesen werden (Burgdorfer, 1984). 1984 beschrieben Johnson et al. diese Spirochäten als neue Spezies, *B. burgdorferi*, den Erreger der ‚Lyme Disease‘.

2.1.1.2 Systematik

Innerhalb der Ordnung der Spirochaetales wurden, basierend auf molekulargenetischen Analysen, bisher mindestens 11 unter dem *B. burgdorferi* sensu lato Komplex zusammengefasste Genospezies beschrieben:

Tabelle 1: Klassifizierung der *B. burgdorferi* sensu lato spp. nach Erstbeschreibungen.

Spezies	Literaturstelle
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Baranton et al., 1992
<i>B. afzelii</i>	Baranton et al., 1992
<i>B. garinii</i>	Baranton et al., 1992
<i>B. valaisiana</i>	Wang et al., 1997
<i>B. lusitaniae</i>	Le Fleche et al., 1997
<i>B. japonica</i>	Kawabata et al., 1993
<i>B. andersonii</i>	Marconi et al., 1995
<i>B. tanukii</i>	Fukunaga et al., 1996
<i>B. turdi</i>	Fukunaga et al., 1996
<i>B. stichettii</i>	Postic et al., 1998
<i>B. sinica</i>	Masuzawa et al., 2001
A14S	Wang et al., 1999a

Als sicher humanpathogen gelten *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* und *B. garinii* (Wang et al., 1999b). Für *B. valaisiana* wird eine Humanpathogenität vermutet, da diese Spezies in Hautbiopaten von Lyme-Borreliose Patienten nachgewiesen werden konnte (Rijpkema et al., 1997). Ein genotypisch und phänotypisch neues Isolat, A14S, des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes konnte erstmals von Wang et al. (1999a) aus Hautbiopaten von Patienten mit Erythema chronicum migrans kultiviert und mittlerweile auch in *I. ricinus* Zecken in Deutschland nachgewiesen werden (Rauter et al., 2002; Wilske et al., 2002; Michel et al., 2003; Richter et al., 2004b).

2.1.1.3 Morphologie und Genom

Borrelien gehören zur Familie der Spirochäten. Sie sind gramnegativ, mikroaerophil, etwa 20 µm lang, 0,3 µm dick und haben eine helikale Struktur. Unter der äußeren Zellmembran liegen sieben bis elf Endoflagellen, die eine schraubenförmige Fortbewegung ermöglichen (Barbour und Hayes, 1986). Das Genom von *B. burgdorferi* sensu lato setzt sich aus einem linearen Chromosom und mehreren zirkulären Plasmiden zusammen (Fraser et al., 1997). Auf den Plasmiden werden wichtige Oberflächenproteine wie das ‚Outer surface protein A‘ (OspA) und das ‚Outer surface protein C‘ (OspC) codiert (Bergstrom et al., 1989).

2.1.1.4 Heterogenität von *B. burgdorferi* sensu lato

Die Isolate der in Europa vertretenen humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* zeigen eine ausgeprägte Heterogenität ihrer OspA- und OspC-Proteine (Wilske et al., 1992, 1993). Wilske et al. (1993, 1996a) definierten acht verschiedene OspA-Typen, basierend auf einer unterschiedlichen Reaktivität mit monoklonalen Anti-OspA-Antikörpern. Die Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* sind homogen in ihrem OspA-Typ und entsprechen OspA-Typ 1 beziehungsweise OspA-Typ 2. Der Spezies *B. garinii*, wurden mittlerweile sechs OspA-Typen (3 bis 8) zugeordnet (Wilske et al., 1993, 1996a).

Da verschiedene OspA-Typen mit unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen einer Lyme Borreliose assoziiert werden, hat die Heterogenität der Borrelien eine große Bedeutung für die Diagnostik (van Dam et al., 1993; Wilske et al., 1993). *B. burgdorferi* sensu stricto (OspA-Typ 1) wird häufig bei Arthritiden und *B. afzelii* (OspA-Typ 2) vermehrt bei Hautmanifestationen der Lyme Borreliose, wie einer Acrodermatitis atrophicans, nachgewiesen (Balmelli und Piffaretti, 1995). *Borrelia garinii* ist die aus Liquor am häufigsten isolierte Spezies, weshalb sie vermutlich mit der klinischen Manifestation einer Neuroborreliose assoziiert ist (van Dam et al., 1993; Wilske et al., 1996a). Der häufig im Vektor *I. ricinus* detektierte OspA-Typ 6 konnte selten in klinischem Material nachgewiesen werden, während der häufig aus dem Liquor isolierte OspA-Typ 4 bisher nur einmal aus *I. ricinus* angezüchtet werden konnte (Hu et al., 2001).

2.1.1.5 Geographische Verbreitung

Bisher konnte Lyme Borreliose in Europa, den USA, Australien und Asien nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den USA deckt sich in Europa die Verbreitung von *B. burgdorferi* sensu lato mit der des Vektors *I. ricinus* (Beichel et al., 1996; Hubálek und Halouzka, 1997; Postic et al., 1997). Dabei ist die Verbreitung von *I. ricinus* unmittelbar mit der Verfügbarkeit geeigneter Wirtstiere assoziiert (Gray et al., 1998; Liebisch und Liebisch, 2003) und wird durch klimatische Faktoren beeinflusst (Sonenshine, 1993; Hillyard, 1996). So konnten Fingerle et al. (1994) bei einer Prävalenzstudie von *I. ricinus* Zecken aus vier verschiedenen süddeutschen Regionen die höchste Durchseuchungsrate

von *B. burgdorferi* sensu lato bei *I. ricinus* nachweisen, die aus der Region mit den größten Jahresisothermen stammten.

2.1.1.6 Vektor

In Europa können Borrelien, außer durch den hier bedeutsamsten Vektor *I. ricinus* (Hubálek und Halouzka, 1997), auch durch die ‚Igelzecke‘ *I. hexagonus* (Beichel et al., 1996), die ‚Fuchszecke‘ *I. canisuga* (Liebisch und Liebisch, 1999), und *I. uriae*, einer Zecke, die vor allem See- und Zugvögel an den Küsten Frankreichs, Englands, Irlands und Skandinaviens infiziert, übertragen werden (Olsen et al., 1993 und 1995). In Osteuropa und Asien stellen *I. persulcatus* und in den USA *I. scapularis* und *I. pacificus* den Hauptvektor für Borrelien dar (Anderson 1989; Gray et al., 1998; Postic et al., 1997).

2.1.1.7 Übertragung

In der Natur wechseln Borrelien zwischen Vektorzecken und Vertebratenwirt. Im Vektor vermehren sich die Spirochäten während der Blutmahlzeit, migrieren durch die Darmwand und verteilen sich per Hämolymphe in zahlreiche Gewebe, unter anderem auch in die Speicheldrüsen, von wo aus sie mit dem Speichel übertragen werden können. Während dieser Übertragung sind die Borrelien stark wechselnden Umweltbedingungen, wie Temperaturdifferenzen, unterschiedlichen pH-Werten und der Immunantwort des Wirts ausgesetzt. Zu den entsprechenden Anpassungsmechanismen gehört eine Veränderung und daraus resultierende Variabilität der Expression der Oberflächenproteine OspA und OspC (Fingerle 2000, 2002). OspA wird vermehrt in nüchternen Zecken exprimiert (Fingerle et al., 1995), möglicherweise um eine Adhäsion der Spirochäten am Mitteldarm und somit das Verweilen der Borrelien über einen längeren Zeitraum ohne Blutmahlzeit in der Zecke zu ermöglichen. Während des Saugakts wird dagegen die Expression von OspC gesteigert, was mit der Wanderung der Borrelien in die Speicheldrüsen und dem warmblütigen Wirt assoziiert ist. Im Wirt und gesaugten Zecken kann dementsprechend eine höhere Konzentration von OspC detektiert werden (Schwan et al., 2000; Fingerle et al. 2000, 2002; Pal et al., 2004).

Die Anzahl von Borrelien in Zecken variiert schätzungsweise zwischen 25 bis knapp

200 000. Eine Studie von Kahl et al. (1998) zur Übertragungsdauer von *B. burgdorferi* durch *I. ricinus* Nymphen an Gerbils zeigte, dass die Übertragungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Dauer des Saugakts anstieg, wobei aber auch schon in den ersten Stunden eine geringe Transmission von Borrelien festgestellt werden konnte. Zudem wird vermutet, dass bestimmte im Speichel von *I. ricinus* Zecken vorhandene Komponenten, die Transmission von Borrelien unterstützen. Auf Grund dieser biologischen Begebenheiten wird *I. ricinus* eine große Kompetenz als Vektor zugeschrieben (Matuscka und Richter, 2002).

Die Gefahr, dass Borrelien durch eine Zecke, die sich an einem Haustier infiziert hat, direkt auf den Tierbesitzer weiter übertragen werden können, scheint nicht zu bestehen (Goossens et al., 2001).

2.1.1.8 Lyme Borreliose beim Menschen

Die Lyme Borreliose des Menschen ist eine Multisystemkrankheit, die sich primär als lokale Hautinfektion (Erythema migrans) manifestiert. Innerhalb von Tagen und Wochen kann eine Dissemination der Borrelien in andere Organe, meistens in das zentrale Nervensystem, Gelenke oder Myokard erfolgen. Dabei sind die Symptome variabel (Steere, 1989; Oschmann et al., 1998). Die klinischen Bilder und der Verlauf werden in drei Stadien eingeteilt, wobei Stadium I und II den Frühmanifestationen und Stadium III den Spätmanifestationen zugeordnet wird. Diese Stadien können unabhängig voneinander auftreten (Steere, 1989):

Tabelle 2: Stadien der Lyme Borreliose beim Menschen.

<p>Stadium I: Tage bis Wochen nach einem Zeckenstich bildet sich an der Einstichstelle eine makulöse oder papulöse Effloreszenz, die sich im weiteren Verlauf zu einem ringförmigen Erythem entwickelt, das beim Menschen in 90% der Fälle beobachtet wird (Huppertz et al., 1999). Dieses Erythema migrans, auch ‚Wanderröte‘ genannt, ist die häufigste Frühmanifestation und beim Menschen Leitsymptom der Lyme Borreliose. Gleichzeitig können Allgemeinsymptome wie Fieber und Myalgien auftreten (Afzelius, 1910; Steere et al., 1977a).</p>

Stadium II: Die häufigste Manifestation des zweiten Stadiums ist die Neuroborreliose, insbesondere die lymphozytäre Meningoradikulitis, auch als ‚Bannwarth Syndrom‘ bezeichnet, die mit radikulären Schmerzsymptomen und Hirnnervenpareesen assoziiert ist. Dieses Stadium tritt Wochen bis Monate nach einem Zeckenstich ein (Pfister et al., 1993). Zudem können ein Borrelien-Lymphozytom (Weber et al., 1985) oder eine Lyme Karditis auftreten (Van der Linde et al., 1993).

Stadium III: Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich treten die Lyme Arthritis und die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) in Erscheinung. Die Lyme Arthritis kann mono- oder oligoartikulär, chronisch oder intermittierend verlaufen. Meist wechseln sich akute Krankheitsgeschehen mit asymptomatischen Phasen ab (Steere et al., 1977b). Bei einer ACA kommt es beim Menschen nach monate- bis jahrelanger Inkubationszeit zu zigarettenpapierartiger Fältelung und livider Verfärbung der Haut und plastischem Hervortreten der Gefäße (Asbrink et al., 1993).

Da bei stark Zecken-exponierten Menschen in endemischen Gebieten häufig eine Serokonversion aber keine klinische Manifestation stattfindet, wird vermutet, dass die Mehrzahl der Borrelien-Infektionen subklinisch oder selbstlimitierend verläuft. So konnte bei einer Untersuchung in Bayern in 11% der Seren von Menschen, die bisher nie Anzeichen einer Lyme Borreliose hatten, IgG- Antikörper gegen Borrelien nachgewiesen werden (Reimer et al., 1999). In seltenen Fällen können die Spirochäten selbst nach antibiotischer Behandlung im Gewebe persistieren und Symptome verursachen (Preac-Mursic et al., 1989).

2.1.1.9 Borreliose beim Tier

Da Haus-, Nutz- und Wildtiere in der Regel in einem wesentlich stärkeren Maße als Menschen einem Befall mit Zecken ausgesetzt sind, ist das Risiko einer Infektion entsprechend größer. Dementsprechend weisen serologische Studien auf einen häufigen Kontakt von Tieren mit dem Erreger hin. Bei Tieren ist der Zusammenhang zwischen einer

Infektion, einer klinischen Manifestation und der Persistenz der Erreger bisher noch weitgehend ungeklärt (Skotarczak, 2002).

Hund

In endemischen Gebieten findet man bei Hunden häufig eine Serokonversion ohne klinische Manifestation. Goossens et al. (2001) ermittelten für klinisch gesunde Hunde in den Niederlanden eine Seroprävalenz von 86%. In Deutschland stammt die umfassendste Studie aus dem norddeutschen Raum, wo je nach Bundesland Seroprävalenzen von 16,3% bis 25,3% ermittelt wurden (Holst 1996; Holst et al., 1997). In Nordbayern wiesen 35,5% der untersuchten Hundeblyutseren positive Antikörpertiter auf, wobei die Titer signifikant mit klinischen Symptomen korrelierten (Liebisch und Liebisch, 2003).

Hunde, die durch Zecken experimentell mit Borrelien infiziert wurden, aber auch solche bei denen eine natürliche Infektion von *B. burgdorferi* sensu lato nachgewiesen werden konnte, zeigten eine klinische Verlaufsform, die der humanen Lyme Borreliose ähnelte (Callister et al., 2000; Straubinger et al., 2000). Häufig auftretende Symptome im Frühstadium waren Fieber und Lymphadenopathie, wobei vor allem die in der Umgebung der Zeckenstichstelle lokalisierten Lymphknoten betroffen waren. Bei Hunden manifestierte sich die Erkrankung meist in Form von rezidivierenden Oligo- und Monoarthritiden (Straubinger et al., 2000). Diese äußern sich in mehrmonatigen Krankheitsschüben mit intermittierender Lahmheit und Myalgien, wobei bisher noch keine Regelmäßigkeiten für den zeitlichen Ablauf dieser Symptome festgestellt wurden. Selten konnten sich auch Hautveränderungen und eine Myokarditis, und bei älteren Hunden neurologische Symptome und Glomerulopathien entwickeln (Goossens et al., 2001; Skotarczak, 2002; Liebisch und Liebisch, 2003).

Katze

Serologische Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch Katzen für eine Infektion mit durch Zecken übertragene Borrelien empfänglich sind. Die Erkrankung scheint vorwiegend akut oder subakut zu verlaufen, und äußert sich nach einer unbekanntem Inkubationszeit in Schmerzen des Bewegungsapparates, schmerzhafter Schwellung eines oder mehrerer Gelenke, Lahmheit und Schwellung der Lymphknoten (Magnarelli et al, 1990).

Pferd

Auch bei Pferden wurden aus Endemiegebieten hohe Seroprävalenzen beschrieben, wobei die Mehrheit der *B. burgdorferi* sensu lato Infektionen wahrscheinlich symptomlos verläuft (Burgess, 1988; Venner und Degen, 1996; Gall und Pfister, 2004). In den letzten Jahren wurden aber auch Fälle von mit Borrelieninfektionen assoziierten Erkrankungen bei Pferden dokumentiert. Die klinischen Symptome, die beim Pferd in Verbindung mit einer Infektion von *B. burgdorferi* sensu lato beschrieben wurden, sind Leistungsabfall, aus Arthritiden resultierende Lahmheitsschübe, Manifestationen an Haut, Augen und Herz sowie neurologische Störungen (Gerhards und Wolanke, 1996; Schönert et al., 2002; Liebisch und Liebisch, 2003).

Schaf, Rind

Bei Schafen und Rindern scheint eine Borrelien-Infektion meist einen asymptomatischen Verlauf zu nehmen. Bei einer klinischen Manifestation werden Erytheme am Euter, verminderte Milchleistung, Lahmheit durch versteifte geschwollene Gelenke und / oder Klauenentzündung und Aborte beschrieben (Liebisch und Liebisch, 2003). Burgess (1988) konnte im Rahmen einer umfassenden Untersuchung von Rinderseren in einem Endemiegebiet in Wisconsin (USA) eine saisonale Häufung der oben beschriebenen Symptome und höhere Seroprävalenzen in den Monaten Mai bis Juni und im Oktober beobachten. Diese Beobachtungen wurden im Zusammenhang mit der Exposition der Tiere mit Borrelien übertragender Zecken während der Weidesaison interpretiert (vgl. Kap. 2.2.5).

Wildtiere

Interessanterweise zeigen Wildtiere, die einem starken Zeckenbefall ausgesetzt sind, meist keine klinische Manifestation. Als Ursache wird eine Art ‚Balance‘ des Parasiten-Wirts-Systems vermutet (Skotarczak, 2002).

2.1.2 *A. phagocytophilum*

2.1.2.1 Geschichtliches

In der Veterinärmedizin waren Ehrlichieninfektionen schon seit längerem bekannt, bis die ersten Fälle in der Humanmedizin beschrieben wurden. Während *E. canis* bereits 1935 von Donatien und Lestoquard dokumentiert wurde, war 1953 *E. sennetsu* die erste als humanpathogen beschriebene Ehrlichienpezies (Marcus et al., 1985). Beide letztgenannten Erreger verursachen eine monozytäre Ehrlichiose (Marcus et al., 1985). Die erste equine granulozytäre Ehrlichiose wurde 1961 in Nordkalifornien dokumentiert (Gribble, 1969). In Deutschland wurden granulozytäre Ehrlichien ebenfalls bei Pferden nachgewiesen (Büscher et al., 1984).

Erst 1994 wurde eine Variante der humanen Ehrlichiose, die sog. humane granulozytäre Ehrlichiose (HGE), die vor allem im mittleren Westen (Wisconsin und Minnesota) und an der Ostküste (Connecticut, New York) auftritt, beschrieben. Der Erreger konnte nach Sequenzierung PCR-amplifizierter 16S-rDNA klassifiziert werden und wurde HGE- Agens (engl. agent of human granulocytic ehrlichiosis) genannt (Chen et al., 1994), und mit zwei weiteren granulozytären Ehrlichien, *E. equi* und ehemaliger *E. phagocytophila*, in der *E. phagocytophila*-Gruppe zusammengefasst (Rikihisa et al., 1991).

Seitdem wurde eine Vielzahl von Fällen granulozytärer Ehrlichiose beschrieben, vor allem in den USA, wo sie die zweithäufigste durch Zecken übertragene Krankheit darstellt (Bakken et al., 1994; Madigan et al., 1995; Magnarelli et al., 1998). Aber auch in Europa und Asien gewinnt die humane granulozytäre Ehrlichiose (HGE) immer mehr an Bedeutung (Parola und Raoult, 2001). Seit 1995 wurde der serologische Nachweis von granulozytären Ehrlichien bei Menschen und Tieren in verschiedenen europäischen Ländern dokumentiert. Fallberichte in Europa wurden zuerst aus Slovenien (Petrovec et al., 1997) und mittlerweile auch aus vielen anderen europäischen Ländern bei Mensch und Haus- und Wildtieren beschrieben (Olsson Engvall et al., 1996).

2.1.2.2 Systematik

Während das Genus *Ehrlichia* früher in drei Gruppen eingeteilt war, und die Erreger der granulozytären Ehrlichiose HGE, *E. equi* und *E. phagocytophila* unter der *E. phagocytophila*-Gruppe zusammengefasst wurden (Rikihisa, 1991), gibt es seit kurzem eine Neuordnung innerhalb der Klassifikation der Ordnung Rickettsiales, welche auf Homologien der Nukleotidsequenzen der 16S ribosomalen RNA basiert (Dumler et al., 2001):

Tabelle 3: Genus und Erreger modifiziert nach Uilenberg et al. (2004).

Genus	Erreger
<i>Anaplasma</i>	<i>A. phagocytophilum</i> (ehemals <i>A. phagocytophila</i> , <i>E. equi</i> und HGE-Agens) <i>A. platys</i> <i>A. bovis</i> <i>A. marginale</i> (mit <i>A. centrale</i> und <i>A. ovis</i>) <i>A. sp.</i>
<i>Ehrlichia</i>	<i>E. canis</i> <i>E. chaffeensis</i> <i>E. ewingii</i> <i>E. muris</i> <i>C. ruminantium</i>
<i>Neorickettsia</i>	<i>N. helminthoeca</i> <i>N. sennetsu</i> <i>N. risticii</i> SF'-Agens
<i>Wolbachia</i>	<i>Wolbachia</i> spp.

Die Ehrlichienpezies, die HGE verursacht, konnte bisher nicht identifiziert werden. Aufgrund einer großen Homologie mit den Nukleotidsequenzen des 16Sr-RNA-Gens von *E. equi* und *A. phagocytophilum* (Chen et al., 1994), werden diese Erreger der granulozytären Ehrlichiose als eine Spezies, *A. phagocytophilum*, behandelt (Dumler et al., 2001).

2.1.2.3 Morphologie und Eigenschaften

Ehrlichien sind gramnegative obligat intrazelluläre Bakterien. Sie sind etwa 0,5-1,5 µm groß, besitzen eine peptidoglykanhaltige Zellwand und sind durch Tetracykline und Chloramphenicol in ihrem Wachstum hemmbar. Ehrlichien infizieren je nach Spezies Monozyten, Granulozyten oder Thrombozyten von Säugetieren, wo sie in zytoplasmatischen Vakuolen vorliegen und sich dort durch binäre Teilung vermehren (Rikihisa, 1991). Diese Mikrokolonien innerhalb infizierter Zellen werden als sog. Morulae bezeichnet und sind wie die Initialkörper im Blutausschlag nach Giemsa-Färbung sichtbar (Hildebrandt et al., 2002).

2.1.2.4 Geographische Verbreitung

Untersuchungen zur Bestimmung der Prävalenzen von granulozytären Ehrlichien in *I. scapularis* bzw. *I. ricinus* Zecken weisen daraufhin, dass *A. phagocytophilum* in Europa (von Stedingk et al., 1997; Pusterla et al., 1998b; Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999a; Schouls et al., 1999; Christova et al., 2001; Polin et al., 2004) und in den USA (Courtney et al., 2003) weit verbreitet ist. Auch in Asien konnte *A. phagocytophilum* in *I. persulcatus* Zecken in China detektiert werden (Cao et al., 2003). Hinweise für die Verbreitung liefern Prävalenzstudien in Zecken, in denen der Nachweis von *A. phagocytophilum* aus zahlreichen Ländern beschrieben wurde (siehe Kap. 2.3.3.3).

Auch bei Wild-, Haus- und Nutztieren konnten granulozytäre Ehrlichien in den USA (Greig et al., 1996; Walls et al., 1997; Munderloh et al., 2003) und in europäischen Ländern wie Italien (Manna et al., 2004), Spanien (Oporto et al., 2003), Schweden (Olsson Engvall et al., 1996), Norwegen (Stuen et al., 2002), Deutschland (Gerhards et al., 1987; von Loewenich et al., 2003a), Österreich (Petrovec et al., 2003; Polin et al., 2004), in der tschechischen Republik (Petrovec et al., 2003) und in der Schweiz (Liz et al., 2002;

Hoffmann-Lehmann et al., 2004) molekulargenetisch nachgewiesen werden. Dabei scheint das Vorkommen potentieller Wirts- und Reserviertiere (siehe Kap. 2.3.3.2.) die geographische Verbreitung von *A. phagocytophilum* zu beeinflussen (Fingerle et al., 1999a).

2.1.2.5 Vektor

In Europa gelten *I. ricinus* und in den USA *I. scapularis* und *I. pacificus* als die wichtigsten Vektoren für *A. phagocytophilum*. In Asien stellt *I. persulcatus* den Hauptvektor dar (Parola and Raoult, 2001). Munderloh et al. (2003) gelang es, *Anaplasma* spp. aus Blut von Weißwedelhirschen (*Odocoileus virginianus*) mit Hilfe von Zeckenzellkulturen (*I. scapularis*) zu isolieren und die infizierten Zeckenzellen erfolgreich zur Infektion eines Rehs einzusetzen.

2.1.2.6 Übertragung

Die transovarielle Übertragung von *A. phagocytophilum* hat bei der Verbreitung dieses Erregers vermutlich keine große Bedeutung. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse einer Studie aus Spanien unterstützt (Oporto et al., 2003), wo *I. ricinus* Zecken von Kleinsäugetern und Rehen abgesammelt und die Tiere auf eine Infektion mit *A. phagocytophilum* untersucht wurden. Dabei fiel auf, dass die kleinen Säugetiere fast ausschließlich mit Larven befallen waren, während bei Rehen vor allem Nymphen und adulte Zecken gefunden wurden. 38% der Rehe waren mit *A. phagocytophilum* infiziert, während bei Kleinsäugetern keine Infektion nachgewiesen werden konnte.

Innerhalb einer Zeckenpopulation wird *A. phagocytophilum* daher vermutlich zum größten Teil transstadial übertragen. Diese Vermutung wird damit begründet, dass bei adulten Zecken meist deutlich höhere Infektionsraten mit *A. phagocytophilum* festgestellt wurden als bei juvenilen Stadien (siehe Kap. 2.3.3.3) (Ogden et al., 1998; Pusterla et al., 1998b; Fingerle et al., 1999a; Hildebrandt et al., 2002).

2.1.2.7 Granulozytäre Ehrlichiose Mensch

Menschen können durch eine Infektion mit *A. phagocytophilum* erkranken (Bakken et al., 1994; Goodman et al., 1996; Weber et al., 2000). Dabei ist die Form der klinischen Manifestation sehr variabel. Nach einer Inkubationszeit von etwa zwei bis sieben Tagen tritt meist ein akutes Krankheitsbild mit Fieber bis 39,5°C, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Myalgie, Arthralgie und Anorexie auf. Makulöse oder papulöse Exantheme kommen nur bei etwa einem Drittel der Patienten vor (Goodman et al., 1996). Andere klinische Symptome wie Nierenfunktionsstörungen, Affektion der Lunge und Bewusstseinsstörungen sind eher selten. In den meisten Fällen kommt es nach etwa einer Woche zur folgenlosen Ausheilung (Wilske und Fingerle, 1996c, 2000).

Mit einer Erkrankung gehen häufig erhöhte Transaminasewerte (Goodman et al., 1996) und eine Thrombozytopenie und / oder eine Leukopenie einher. In schweren Fällen können bis zu 40% der Leukozyten mit *A. phagocytophilum* befallen sein. Ältere oder immunsupprimierte Menschen haben die Disposition zu schweren Verläufen, bis hin zum tödlichen Ausgang. Ein großer Teil der Infektionen verläuft allerdings klinisch inapparent. Bei einer Koinfektion mit *B. burgdorferi* sensu lato (siehe Kap.2.3.5) kann der Verlauf einer granulozytären Ehrlichiose schwerer und modifiziert sein (Wilske und Fingerle, 1996c, 2000).

2.1.2.8 Granulozytäre Ehrlichiose Tier

Die Erkrankung an einer granulozytären Ehrlichiose scheint bei Haus- und Nutztieren ähnlich wie beim Menschen zu verlaufen. Dabei können sich Tiere mit allen Varianten von *A. phagocytophilum* infizieren und eine klinische Manifestation entwickeln (Olsson Engvall et al., 1996).

Im Blutbild äußert sich die Erkrankung bei Haus- und Nutztieren am häufigsten in Form einer normozytären, normochromen Anämie, einer Thrombozytopenie, einer Lymphopenie und Eosinopenie. Im akuten Stadium können Erreger bzw. Morulae etwa ein bis zwei Wochen p.i. in Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. (Gerhards et al., 1987; Pusterla et al 1999; Olsson Engvall und Egenvall, 2002; Skotarczak, 2003; Manna et al., 2004). Neben diesen Veränderungen im Blutbild ist eine Erhöhung der Leberenzyme ebenfalls wahrscheinlich (Greig et al., 1996).

Pferd

Bei Pferden gilt *A. phagocytophilum* als Erreger der equinen (granulozytären) Ehrlichiose (EGE) (Madigan et al., 1995; Munderloh et al., 1996). In Europa konnten Infektionen mit *A. phagocytophilum* sowie klinische Manifestationen mit diesem Erreger bei Pferden nachgewiesen werden (Johansson et al., 1995; Olsson Engvall et al., 1996; Olsson Engvall und Egenvall, 2002), wobei in Deutschland bisher nur vereinzelt Fälle beschrieben wurden (Büscher et al., 1984; Gerhards et al., 1987; von Loewenich et al., 2003a).

Die Erkrankung verläuft beim Pferd nach einer mehrtägigen Inkubationszeit akut fieberhaft. Als Symptome können vermehrt Bewegungsunwilligkeit, Apathie, unkoordinierte Bewegungen, Gliedmaßenödeme, ein gestörtes Sensorium, Petechien und mäßiger Ikterus auftreten (Gerhards et al., 1987; Olsson Engvall und Egenvall, 2002). Zudem wurde eine altersabhängige Variation der klinischen Befunde beschrieben (Madigan und Gribble, 1987). Die genannten Symptome konnten auch bei experimentellen Infektionen von Pferden mit *A. phagocytophilum* induziert werden (Munderloh et al., 1996).

Hund

Die canine (granulozytäre) Ehrlichiose (CGE) wird beim Hund durch *A. phagocytophilum* verursacht (Skotarczak, 2003). Auch bei Hunden wurden klinische Fälle einer granulozytären Ehrlichiose und der Nachweis von *A. phagocytophilum* in verschiedenen europäischen Ländern beschrieben (Olsson Engvall et al., 1996; Johansson et al., 1995; Olsson Engvall und Egenvall, 2002; Tozon et al., 2003; Manna et al., 2004).

Hunde mit granulozytärer Ehrlichiose haben häufig ein sehr unspezifisches Krankheitsbild, wobei akute, chronische, aber auch subklinische Verlaufsformen auftreten können. Bei einer akuten Infektion sind in der Regel hohes Fieber, Müdigkeit und Inappetenz zu beobachten. Zudem können Lahmheit, gastrointestinale (Skotarczak, 2003; Manna et al., 2004), zentralnervöse Symptome und petechiale Blutungen auf den Schleimhäuten beobachtet werden (Olsson Engvall und Egenvall, 2002). Ein chronischer Verlauf äußert sich in gestörtem Allgemeinbefinden und geringgradiger Lahmheit, verursacht durch Polyarthritiden (Olsson Engvall und Egenvall, 2002; Skotarczak, 2003).

Rind, Schaf

Die granulozytäre Ehrlichiose des Rindes wird auch Bovine Ehrlichiose, ‚Zeckenfieber‘ oder ‚Pasteur Fieber‘ genannt und kommt in den meisten europäischen Ländern vor

(Olsson Engvall et al., 1996). Fälle von granulozytäre Ehrlichiose beim Schaf und Rind wurden in Europa in den letzten Jahren häufiger in Norwegen (Stuen et al., 2002) und *A. phagocytophilum* Infektionen bei Rindern wiederholt in einigen Regionen der Schweiz beschrieben (Pfister et al., 1987; Pusterla et al., 1998b; Liz et al., 2000; Hoffmann-Lehmann et al., 2004). Dabei konnte in der Schweiz innerhalb eines Jahres in verschiedenen Herden ein bimodales Auftreten von klinischen Symptomen beobachtet werden, welche mit einer Infektion mit *A. phagocytophilum* in Verbindung gebracht werden. Die klinische Manifestation trat vor allem bei Tieren auf, die zum ersten Mal auf der Weide grasten. Eine moderate Ausprägung der klinischen Symptome wurde für die Monate Mai / Juni beschrieben, während die stärkste Ausprägung von Ehrlichiose Fällen und die höchsten Antikörpertiter im September auftrat (Kap.2.2.5) (Liz et al., 1994, 2000; Pusterla et al., 1998a, b).

Die klinischen Symptome, die in Verbindung mit einer Infektion mit *A. phagocytophilum* beschrieben werden sind extrem hohes Fieber, Apathie, Bewegungsunlust, Anorexie, respiratorische Symptome und bei Milchvieh ein hochgradiger Rückgang der Milchleistung. Bei Schafen wurden neben diesen Symptomen noch Aborte und eine Verminderung der Fertilität beschrieben (Pfister et al., 1987; Stuen et al., 2002).

Wildtiere

Inwieweit verschiedene Wildtierarten an granulozytärer Ehrlichiose erkranken, und wie sich die klinische Manifestation äußert, ist bisher noch weitgehend ungeklärt (siehe Kap. 2.3.3.2).

2.1.3 Babesien: *B. microti*, *B. divergens*

2.1.3.1 Geschichtliches

Babesien sind nach dem Wissenschaftler Victor Babès benannt, der 1888 als Erster die birnenförmigen, Plasmodium-ähnlichen Parasiten als Ursache einer fieberhaften Hämoglobinurie bei Rindern identifizierte (Hunfeld et al., 2002). *Babesia divergens* wurde erstmals 1911 von M'Fadyean und Stockman beschrieben, die den Erreger zunächst *Piroplasma divergens* nannten. *Babesia microti* wurde erstmals 1912 von Franca als

Smithia microtia aus einer Feldmaus (*Microtus incertus Selys*) aus der Umgebung von Lissabon nachgewiesen.

Klinische Erkrankungen von Menschen an Babesiose werden seit 1956 beobachtet (Hunfeld et al., 2002; Walter und Weber, 1981). Als Ursache wurden in Europa Rinderbabesien wie *B. divergens*, unter anderem in Jugoslawien, Frankreich und Nord Irland erkannt (Gorenflot et al., 1976; Walter und Liebisch, 1980). 1968 wurde *B. microti* erstmals als Erreger einer humaner Babesiose in den USA festgestellt. Zusätzlich wurden seit kurzem *Babesia* Spezies unbekannter Identität (WA1 Typ, MO1, CA1-CA4) als Pathogene für Menschen in Nord-Amerika in Erwägung gezogen, wobei phylogenetische Studien zeigten, dass diese Parasiten ursprünglich von Hunden oder Wildtieren stammen könnten (Kjemtrup und Conrad, 2000). In Europa wurden zuletzt bisher unbeschriebene kleine Babesien bei erkrankten Hunden gefunden, die *B. microti* phylogenetisch sehr nahe stehen (Zahler et al., 2000a,b; Camacho et al., 2003). Da die 18Sr-DNA Sequenz nicht identisch mit *B. microti* ist, wurde dieser neue Erreger von Hunden aus Spanien ‚*Theileriae annae*‘ genannt (Camacho et al., 2003).

2.1.3.2 Systematik

Babesien gehören der Ordnung *Piroplasmida*, der Familie *Babesiidae* und dem Genus *Babesia* an (Telford III et al., 1993; Kjemtrup und Conrad, 2000). Bis heute wurden weltweit etwa 100 Babesienspezies beschrieben (Hunfeld et al., 2002).

2.1.3.3 Morphologie, Eigenschaften

Babesien sind intraerythrozytäre Parasiten von Säugetieren, die meisten Arten finden sich bei Nagern, Carnivoren und Wiederkäuern, wenige Arten auch bei Vögeln. Alle Arten von Haussäugetieren sind Wirte spezifischer Babesienarten. Die einkernigen, 0,3-5 µm langen Merozoiten können je nach Entwicklungsstadium amöbid, ring-, tropfen- oder birnenförmig, meist paarweise, seltener zu mehreren zentral oder marginal im Erythrozyten von Säugetieren vorliegen. Babesien werden in große Arten (Merozoiten größer als 3 µm) und kleine Arten (Merozoiten kleiner als 3 µm) eingeteilt. Charakteristisch sind große Rund- und Zwillingsformen. *B. divergens* wird mit 1,7 µm Länge zu den kleinen Babesien gezählt, wobei die birnenförmigen Stadien im stumpfen Winkel zueinander und marginal

im Erythrozyten des Wirtes vorliegen (Hinaidy, 1981; Eckert et al., 2005). *B. microti* zählt mit 1-3 µm Länge ebenfalls zu den kleinen *Babesia*-Arten. Die Merozoiten liegen zentral im Erythrozyten und sind in Form eines Malteserkreuzes angeordnet (Krampitz, 1979; Rommel et al., 2000; Eckert et al., 2005).

2.1.3.4 Geographische Verbreitung

Babesia divergens kommt in ganz Europa lokal oder regional, im Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* und *I. persulcatus*, von Finnland bis zum Mittelmeer, von der Schwarzmeerküste bis in die Höhenlagen des Libanon und Nordafrika vor (Zintl et al., 2003; Eckert et al., 2005). Da *B. microti* sowohl in Wirtstieren (siehe Kap. 2.3.4.1), als auch in *I. ricinus* Zecken verschiedener europäischer Länder nachgewiesen wurde (Duh et al., 2001; Hartelt et al., 2003; Skotarczak und Cichocka, 2001; Kálmán et al., 2003), scheint auch diese Babesienart in Europa weit verbreitet vorzukommen.

2.1.3.5 Vektor

Nur Arten der Gattung *Ixodes* übertragen *B. microti*, und zwar *I. trianguliceps*, *I. canisuga* (Hussein, 1980), *I. ricinus* (Walter und Liebisch, 1980), *I. persulcatus* (Zintl et al., 2003), *I. dammini* (Spielmann et al., 1979), *I. pacificus* und *I. scapularis* (Oliveira und Kreier, 1979).

In Europa stellt *I. ricinus* den Hauptvektor für *B. microti* dar (Homer et al., 2000). So gelang es Walter (1981) durch eine *I. ricinus* übertragene *B. microti* Infektion bei Goldhamstern eine lang anhaltende Babesien-Parasitämie zu induzieren. Gray et al. (2002) konnten außerdem an einem Transmissionsexperiment mit Gerbilen zeigen, dass auch verschiedene *B. microti* Stämme unterschiedlicher geographischer Herkunft, *I. ricinus* infizieren und durch diese Zecken weiter übertragen werden können. In Deutschland fanden Krampitz et al. (1979) in einer Region um München bei Babesien infizierten Kleinsäugetern ausschließlich *I. ricinus* Zecken.

Babesia divergens wird in Europa ebenfalls durch *I. ricinus* übertragen (Homer et al., 2000; Rommel et al., 2000; Zintl et al., 2003). Diese Vektorfunktion konnten Lewis und Young, (1980) bestätigen, da es ihnen gelang einen humanen *B. divergens* Stamm von einem infizierten Kalb mittels *I. ricinus* auf Kälber und Gerbile zu übertragen.

2.1.3.6 Übertragung und Entwicklung

Babesien haben ein sexuelles Stadium im Vektor *I. ricinus*, gefolgt von asexuellen Teilungsstadien in Erythrozyten des Wirtes. Bei einem Zeckenstich werden die Babesien in Form von Sporozoiten per Zeckenspeichel in die Wunde inokuliert. Die Effektivität der Übertragung durch Zecken wird dem Zeckenspeichel zugeschrieben, der vermutlich durch anti-inflammatorische und / oder immunsuppressive Faktoren eine Infektion erleichtert (Ribeiro, 1987). Die Sporozoiten befallen bei *B. microti* und *B. divergens* ausschließlich Erythrozyten in denen sie zunächst Trophozoiten bilden. Durch eine sog. Exodyogenie, eine äußere Knospung, entstehen meist zwei Merozoiten, welche freigesetzt, neue Erythrozyten befallen. Durch diesen Vorgang werden die Wirtserythrozyten zerstört (Homer et al., 2000). Die Infektion kann dann jahrelang persistieren. Diese Merogoniestadien können vom Zeckenweibchen mit dem Blut eines infizierten Wirtes aufgenommen werden. Im Zeckendarm findet die Gamogonie, also die Bildung geschlechtlich differenzierter Gamonten statt, aus denen Zygoten hervorgehen. Diese differenzieren sich zu mobilen Kineten, die in Darmzellen eindringen und sich dort durch eine Sporogonie vermehren. Die Sporokineten wandern anschließend in die Hämolymphe und befallen Hämozyten und verschiedene Körperzellen, unter anderem auch die Speicheldrüsen oder die Oozyten des Ovars, in denen weitere Sporogoniezyklen ablaufen. In Abhängigkeit von der Babesien Spezies findet eine transovarielle Übertragung statt. Durch eine vertikale und transstadiale Übertragung können die Erreger in Naturherden dann auf drei bis vier Tochtergenerationen weitergegeben werden.

Dies ermöglicht, dass Zeckenpopulationen innerhalb eines Endemiegebietes, auch ohne eine erfolgte Neuinfektion an *Babesia* infizierten Wirten, über einige Jahre infiziert bleiben. Da jeweils nur ein Teil der Eier, man vermutet 10-20%, infiziert ist, wird die vertikale Übertragung jedoch begrenzt. *B. divergens* kann von allen Zeckenstadien transstadial, *B. microti* dagegen nur von der Larve zur Nymphe übertragen werden. Bei *B. microti* können nachfolgende Zeckenstadien auf diesem Weg nicht infiziert werden. Inwiefern einzelne Zeckenstadien die verschiedenen Babesienarten übertragen können, hängt von der Adaption des Zeckenvektors an den Säugerwirt und der Babesienart ab (Sonenshine, 1993; Telford III et al., 1993; Kjemtrup und Conrad, 2000; Eckert et al., 2005).

2.1.3.7 Humane Babesiose

Die klinische Manifestation der Babesiose wird durch die Vermehrung der asexuellen Stadien der Parasiten in den Erythrozyten und die daraus resultierende Lysis von Wirtszellen verursacht. Es gibt ein sehr großes Spektrum an Symptomen und mildere und schwerere Verlaufsformen, welche vermutlich mit dem Ausmaß der Parasitämie zusammenhängen. Die Inkubationszeit kann von wenigen Wochen bis zu drei Monate dauern. Bei einer starken Ausprägung kann ein Malaria-ähnliches Krankheitsbild entstehen, mit Symptomen wie Fieber, Müdigkeit, Myalgien und Anämie. In manchen Fällen wurden Hämaturie, Ikterus, Nausea, Emesis, Gewichtsverlust und auch Hepatomegalie und Splenomegalie beschrieben. Eine hämolytische Anämie dauert mehrere Tage bis Monate und tritt vor allem bei schwereren Fällen, meist in älteren oder splenektomierten Menschen auf (Sonenshine, 1993; Gorenflot et al., 1998; Homer et al., 2000).

Bei einer Infektion mit *B. divergens* in Europa zeigen die Fälle meist einen schwereren Verlauf als solche die beispielsweise in den USA durch *B. microti* verursacht werden. Die meisten dieser Patienten waren vor der Infektion splenektomiert worden und hatten als Folge einer schweren Hämolyse eine starke Hämoglobinurie, gefolgt von Gelbsucht. In solch schweren Fällen entwickelten die Patienten ein Schock-ähnliches Krankheitsbild mit Nierenversagen und Lungenödem (Gorenflot et al., 1998; Homer et al., 2000)

2.1.3.8 Babesiose des Rindes

Das Ausmaß der klinischen Manifestation ist abhängig von der Infektionsdosis der Parasiten (Purnell et al., 1978), der Anzahl infizierter Zecken, die an einem Wirtstier parasitieren, des Immunstatus des Wirtstiers und der Virulenz des infizierenden Stammes. Dementsprechend können bei einer *B. divergens*-Infektion beim Rind unterschiedlich schwere Verlaufsformen auftreten (Zintl et al., 2003). Bei älteren Tieren der zweiten Weidesaison tritt ohne vorherige Exposition eine akute Erkrankung auf. In der Regel manifestiert sich die Erkrankung nach einer Inkubationszeit von 8-15 Tagen in Form eines gestörten Allgemeinbefindens, Inappetenz, Fieber, Anämie, Hämoglobinurie und später auch Ikterus, Tachykardie, Pansenatonie und einem Absinken der Milchleistung bei Milchkühen. Charakteristisch ist die im Verlauf einer bovinen Babesiose deutlich sichtbar

werdende Hämoglobinurie, weshalb diese Erkrankung auch als ‚seuchenhafte Hämoglobinurie‘, ‚Weiderot‘, ‚Blutharnen‘ oder ‚Mairot‘ bezeichnet wird (Hinaidy, 1981; Rommel et al., 2000; Eckert et al., 2005). Die Hämoglobinurie ist häufig das erste Krankheitszeichen, das vom Besitzer wahrgenommen wird und tritt zum Höhepunkt der Hämolyse auf (Purnell, 1981).

Todesfälle sind Folgen eines Herzversagens oder einer Niereninsuffizienz (Zintl et al., 2000), in Irland wurde für 1983 eine Prävalenz von 10% dokumentiert (Gray und Harte, 1985).

Neben den oben beschriebenen Verlaufsformen treten häufig subklinische Infektionen auf, die mit einer schwachen Parasitämie, geringgradigem Fieber und Anorexie einhergehen (Zintl et al., 2003; Devos und Geysen, 2004).

2.2 Vektor: *I. ricinus*

2.2.1 Systematik und Morphologie

Ixodes ricinus, auch „gemeiner Holzbock“ genannt, gehört zur Familie der *Ixodidae*, der Schildzecken. Eine sklerotisierte Platte, das Skutum, bedeckt beim 2-3 mm großen Männchen den gesamten Körper, beim ungesogenen 3-4 mm großen Weibchen nur den vorderen Teil, so dass sich der Körper des Weibchens bei einer Blutmahlzeit bis auf eine Größe von 1 cm ausdehnen kann. Die Farbe der Männchen ist schwarzbraun, die der Weibchen kastanienbraun, wobei sich die Weibchen im vollgesogenen Zustand blaugrau färben. Am Capitulum der Zecke befinden sich Taster (Pedipalpen) und stechend-saugende Mundwerkzeuge (Hypostom und Chelizeren), welche zum Blutsaugen benötigt werden (Hillyard, 1996; Rommel et al., 2000; Liebisch und Liebisch, 2003).

2.2.2 Geographische Verbreitung und Habitat

Ixodes ricinus ist die in Mitteleuropa häufigste Zeckenart (Liebisch und Liebisch, 1999; Eckert et al., 2005). Die Verbreitung erstreckt sich von Portugal bis zum Kaspischen Meer und vom Süden Skandinaviens bis nach Nordafrika. In diesem Verbreitungsgebiet kann *I. ricinus* in Höhen von 0-2000 m ü. M. angetroffen werden (Sonenshine 1993; Eckert et al.,

2005). Den wesentlichsten Einfluß auf die geographische Verbreitung haben dabei klimatische Faktoren, da potentielle Wirtstierarten auch außerhalb des Verbreitungsgebiets dieser Zeckenart vorkommen (Liebisch und Liebisch, 2003). In Deutschland stellen waldreiche Gebiete mit relativ hoher Luftfeuchtigkeit von über 75 % das bevorzugte Habitat von *I. ricinus* dar (Hillyard, 1996; Gray et al., 1998; Parola und Raoult, 2001). Dabei lebt diese Zeckenart in bodennaher Vegetation am Übergang von Wiesen zu dichtem Untergestrüpp, an Waldlichtungen oder -pfaden, Wildwechsell, aber auch offene Gebiete ohne Baumbestand mit Büschen bieten einen geeigneten Lebensraum (Sonenshine, 1993; Süss und Schrader, 2004). Während der Aktivitätsphase und der Suche nach einem Wirt, erklimmen die Zecken exponierte Stellen dicht unterhalb der Spitzen der Vegetation (Liebisch, 2003). Die Höhe ist dabei vom Zeckenstadium und der Größe der jeweils bevorzugten Wirtstiere abhängig (Sonenshine, 1993; Süss und Schrader, 2004). Die Verfügbarkeit geeigneter Wirtstiere ist ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Verbreitung und Vorkommen dieser Zecken hat (Anderson 1989; Gern et al., 1998; Gray et al., 1998).

2.2.3 Wirtsfindung, Saugakt

Alle Stadien dieser Zeckenart verfügen über hochentwickelte Sinnesorgane, die der Wirtsfindung dienen. So erfolgt die Wahrnehmung von Vibrationen, Duftstoffen und Temperaturen mit dem Hallerschen Organ, einer mit Sinneshaaren versehenen Grube am Tarsus des ersten Beinpaars, während Photosensillen zur Wahrnehmung von Lichtreizen dienen und Chemosensillen, an den Palpen und Chelae, Gewebsflüssigkeiten differenzieren können. Von Wirtstieren abgesonderte volatile Substanzen wie Kohlendioxid und Pheromone werden über hochsensitive Rezeptoren detektiert (Sonenshine, 1991; Liebisch und Liebisch, 2003; Eckert et al., 2005).

Bei der Wirtssuche klammern sich die Zecken mit den hinteren drei Beinpaaren an der Vegetation fest, während das vorderste, mit den oben beschriebenen Sinnesorganen ausgestattete, Beinpaar abgespreizt wird. In dieser charakteristischen Wartehaltung verweilt die Zecke, bis ein geeigneter Wirt vorbeistreift, und sie sich an ihn klammert oder auf ihn fallen lässt. Auf dem Wirt sucht die Zecke eine geeignete Einstichstelle, bevorzugt an schwach behaarten feinhäutigen gut durchbluteten Körperstellen (Liebisch und Liebisch, 2003; Süss und Schrader, 2004). Erst nach 24 bis 36 Stunden beginnt die Zecke

mit dem eigentlichen Saugen, wobei weibliche Adulte dabei das 200-fache ihres Körpergewichts aufnehmen können (Sonenshine, 1991; Süss und Schrader, 2004). Der Saugakt kann über 2-15 Tage dauern (Parola und Raoult, 2001; Eckert et al., 2005).

2.2.4 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus von *I. ricinus* kann in Abhängigkeit von umweltbedingten Faktoren wie Lufttemperatur, Luftfeuchtigkeit und Licht, und der Verfügbarkeit von geeigneten Wirtstieren 2-6 Jahre dauern (Liebisch und Liebisch, 2003). *Ixodes* Zecken durchlaufen dabei drei Entwicklungsstadien, wobei jedes Stadium zur Weiterentwicklung eine Blutmahlzeit benötigt und über ein spezifisches Wirtstierspektrum verfügt, welches sich aus zahlreichen kleineren oder größeren Säugetierarten, Vögeln und auch Reptilien zusammensetzt. (Anderson et al., 1988; Hillyard, 1996; Gern et al., 1998). Die Entwicklung verläuft vom Ei über ein sechsbeiniges Larvenstadium und ein achtbeiniges Nymphenstadium zur Adultzecke. Die Kopulation von Männchen und Weibchen erfolgt noch während der Blutmahlzeit der weiblichen *I. ricinus* Zecke. Die vollgesogenen und befruchteten Weibchen fallen vom Wirt ab und legen 8 bis 30 Tage später mehrere 1000 Eier. Die Weibchen sterben nach erfolgter Eiablage (Rommel et al., 2000, Eckert et al., 2005).

Ixodes Zecken verfügen über ein sehr breites Wirtsspektrum, wobei Larven und Nymphen kleinere Säugetiere, Reptilien und Vögel und adulte Zecken größere Säugetiere (Haus-, Nutz- und Wildtiere) als Wirte bevorzugen (Anderson 1989; Gern et al., 1998; Gray et al., 1998).

2.2.5 Jahreszeitliche Aktivität

Die Zeckenaktivität ist vor allem von klimatischen Faktoren abhängig und steigt, wenn eine durchschnittliche Tagestemperatur von 7 °C überschritten wird (Sonenshine, 1991). Die optimalen Temperaturwerte liegen zwischen 17 und 20°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 80 bis 95% wird bevorzugt (Rommel et al., 2000). *Ixodes ricinus* Zecken zeigen im Verlauf eines Jahres, mit einem für Deutschland typischen Wetterverlauf, eine bimodale Aktivität. Diese äußert sich in zwei Populationshöhepunkten, die bei den adulten Zecken in den Monaten Mai bis Juni und ab der zweiten Septemberhälfte bis Oktober liegen. Nymphen sind dagegen vermehrt im April- bis Mai

und im September bis Oktober anzutreffen. Die Zeckenlarven finden sich an der Vegetation mit Höhepunkten in den Monaten Mai bis Juni und August bis Oktober. Diese saisonalen ‚peaks‘ in der Zeckenpopulation entsprechen dem saisonalen Befall der Wirtstiere. Frühling und Herbst sind dem nach für alle Zeckenstadien die Jahreszeiten der parasitischen Phase von *I. ricinus* (Sonenshine, 1993; Gray et al., 1998; Eckert et al., 2005). Bei ungünstigen Umweltbedingungen tritt eine Diapause, ein neurohormonell bedingter Zustand geringer metabolischer Aktivität ein, der den Zecken ermöglicht, das Populationswachstum Perioden optimaler äußerer Bedingungen anzupassen (Sonenshine, 1993).

2.3 Epidemiologie

2.3.1 *I. ricinus*: Bedeutung als Vektor

Es wird geschätzt, dass in Europa mehr als 95 % aller durch Zecken übertragener Erkrankungen durch *I. ricinus* und *I. persulcatus* übertragen werden. In Deutschland ist *I. ricinus* der bedeutsamste Vektor für die in Veterinär- und Humanmedizin relevanten Krankheitserreger *B. burgdorferi* sensu lato, Zeckenenzephalitisviren (FSME), *A. phagocytophilum*, *B. divergens* und *B. microti* (Hillyard, 1996; Sparagano et al., 1999; Parola und Raoult, 2001; Süss und Schrader, 2004).

Für die Epidemiologie dieser durch *Ixodes* übertragenen Erreger sind das breite Wirtsspektrum (siehe Kap. 2.3.2.1, 2.3.3.1, 2.3.4.1), die Reservoirfunktion von Wirtstieren und Zecken (siehe Kap. 2.3.2.1 bis 2.3.4.5), das Ausmaß der Zeckeninfestation und die Übertragungsmechanismen innerhalb einer Zeckenpopulation von großer Bedeutung (Parola und Raoult, 2001).

Zwischen verschiedenen Entwicklungsstadien von Zecken können Erreger transstadial und / oder transovariell weiterverbreitet werden (siehe Kap. 2.1.1.7, 2.1.2.6, 2.1.3.6). Bei einer transstadialen Übertragung werden Mikroorganismen eines Zeckenstadiums während der Häutung auf das nächste Entwicklungsstadium weitergegeben. Wird dagegen ein Erreger vom Weibchen auf das Ei und somit auf die nächste Generation übertragen, spricht man von einer transovariellen bzw. einer vertikalen Übertragung (Eckert et al., 2005). Infiziert dabei aber der Erreger nur die Ovarien und nicht die Speicheldrüsen der Zecke, kann er nicht auf einen potentiellen Wirt übertragen werden und dort die entsprechende Krankheit

verursachen (Paroloa und Raoult, 2001). Zudem beherbergen Zecken auch Endosymbionten, wie einige Rickettsien- oder Wolbachienspezies, die zwar transstadial und transovariell übertragen werden, aber nach bisherigen Kenntnissen apathogen sind (Benson et al., 2004). Zecken werden erst dann zum Vektor, wenn diese Mikroorganismen beim Saugakt an einen anderen Wirt „inokulativ“ durch den kontinuierlich abgegebenen Speichel und gelegentliche Regurgitation des Darminhalts übertragen werden (Liebisch und Liebisch, 2003). Da der Stich durch Absonderung von anästhetisch wirkenden Stoffen mit dem Zeckenspeichel keine Schmerzen verursacht, bleibt die Zecke oft unbemerkt und kann beliebig lange Blut saugen. Die Übertragungswahrscheinlichkeit potentieller Krankheitserreger, wie beispielsweise *B. burgdorferi* sensu lato, nimmt aber mit der Dauer des Saugakts zu, daher sollten Zecken frühstmöglich vom Körper entfernt werden (Piesman et al., 1991; Kahl et al., 1998).

2.3.2 *B. burgdorferi* sensu lato

2.3.2.1 Infektionsspektrum, Wirtstiere, Reservoir

Das Wirtstierspektrum von *B. burgdorferi* sensu lato umfasst zahlreiche Säugetier- und Vogelarten (Gern et al., 1998; Anderson 1988; Kurtenbach et al., 1998). In Europa gelten kleine Säugetiere wie die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) als die wichtigsten Träger von *B. burgdorferi* sensu lato (Gray et al., 1992). Ungulaten wie Rehe scheinen keine große Kompetenz als Reservoir für *B. burgdorferi* sensu lato zu besitzen (Gern et al., 1998). Dementsprechend fanden Matuschka et al. (1993) in gesaugten Zecken von Rehen in der Umgebung von Berlin eine sehr niedrige Infektionsrate mit diesen Spirochäten, während etwa bei einem Fünftel von Zecken, die in der Vegetation der selben Region gesammelt wurden, eine Infektion mit *B. burgdorferi* sensu lato nachweisbar war. Dies führte zu der Annahme, dass ein Kontakt mit diesen Wirtstieren zu einer Eliminierung einer zunächst vorhandenen Borrelieninfektion in der Zecke führen kann. In vorangegangenen Studien wurden ähnliche Beobachtungen für Amseln dokumentiert, und Fikrig et al. (1990) zeigten, dass eine Immunisierung von Mäusen mit einer OspA-Vakzine zum Erlischen der Spirochäteninfektion im Zeckendarm während des Blutsaugens an diesen Mäusen führte. Daraus wurde gefolgert, dass gerade bei Tieren die einem häufigen Antigenkontakt durch

starken Zeckenbefall ausgesetzt sind, möglicherweise gegen Borrelien gerichtete Immunglobuline die Ursache dieses Phänomens sein könnten. Da Matuschka et al. aber nur in wenigen der untersuchten Rehe entsprechende Antikörper nachweisen konnten, vermutete man, dass noch andere hämatogene Komponenten eine bakterizide Wirkung haben könnten. Außer diesen Wildtierarten wird auch Rindern und Schafen keine große Reservoirkompetenz für Borrelien zugeschrieben (Gern et al., 1998; Gray et al., 1998).

Trotz des großen Spektrums potentieller Wirte, weisen verschiedene Studien darauf hin, dass einige *Borrelia*-Genospezies eine gewisse Wirtsspezifität haben könnten. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung, dass einzelne *B. burgdorferi* sensu lato Spezies bevorzugt in bestimmten Wirtstieren gefunden werden. *B. afzelii* wurde vermehrt in Nagetieren und *B. garinii* und *B. valaisiana* vor allem in Vögeln (Olsen et al., 1995) gefunden. *B. burgdorferi* sensu stricto scheint dagegen keine Assoziation mit bestimmten Wirtstierarten zu zeigen (Humair et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998; Richter et al., 2004a). Zuletzt beschrieben Richter et al. (2004b) eine ausgeprägte Wirtsspezifität von A14S für *Gliridae* (Schläfer). Zudem dokumentierten Olsen et al. (1995), dass in *I. ricinus* Zecken von Zugvögeln aus Skandinavien, die vom Süden oder Südosten des Landes kamen, fast ausschließlich *B. garinii* detektiert werden konnte, während bei Zugvögeln aus dem Südwesten Skandinaviens eher ein heterogenes Infektionsmuster beobachtet wurde. Dies führt zu der Annahme dass eine Wirtsspezifität teilweise für die die heterogene Verbreitung von *B. burgdorferi* sensu lato in Europa verantwortlich sein könnte.

2.3.2.2 Prävalenzen von nüchternen *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato

In den meisten europäischen Regionen liegen die durchschnittlichen Infektionsraten für *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato bei 10-20%. Dabei lassen sich regionale Unterschiede beobachten. In Süddeutschland, einem Endemiegebiet für Borreliose, fanden Fingerle et al. (1994, 1999a) im Stadtgebiet (Englischer Garten) und Raum München und in der Umgebung von Ulm 33,8 bis 37,4 % infizierte adulte Zecken und 25,7 bis 30,8% infizierte Nymphen. Ähnliche Prävalenzen von 35% wurden auch in Konstanz (Rauter et al., 2002) ermittelt und aus südeuropäischen Regionen wie Kroatien oder Norditalien wurden noch höhere Durchseuchungsraten von 45 bzw. 50% dokumentiert (Rijpkema et al., 1996a;

Cinco et al., 1998), während beispielsweise in der Schweiz bislang niedrigere Infektionsraten von 22,4% (Casati et al., 2004) beschrieben wurden.

In Europa lassen sich zudem deutliche Unterschiede in den Infektionsraten der verschiedenen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* beobachten. Die höchste Prävalenz zeigen adulte Zecken mit ca. 20%, bei Nymphen liegt die Durchseuchungsrate bei ca. 10% und bei Larven bei nur ca. 1% (Fingerle et al., 1994; Rijpkema et al., 1996a; Kirstein et al., 1997; Hubálek et al., 1998; Kampen et al., 2004). Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Entwicklungsstadien von *I. scapularis* Zecken in den USA gemacht werden (Wang et al., 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass die Übertragung von Borrelien innerhalb der Zeckengeneration vor allem transstadial erfolgt (Fingerle et al., 1994; Gray et al., 1998).

Um eine mögliche Veränderung der Infektionsraten innerhalb eines Jahres in einer Zeckenpopulation zu beobachten, wurden in wenigen Studien auch die Durchseuchungsraten von *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato eines gleichen Gebietes zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. So konnten Fingerle et al. (1994) in drei Gebieten bei Nymphen saisonal eine signifikante Zunahme der Infektionsrate von 14,3 auf 20,1% vom Frühling zum Sommer hin beobachten. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen geologischen Daten, der Vegetation, Zeckendichte und der Infektionsrate festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Hubálek et al. (2004) dokumentiert, die in der Tschechischen Republik von 1997 bis 2003 in gesaugten Zecken ebenfalls zum Sommer hin einen deutlichen Anstieg der Durchseuchungsraten beobachteten, wobei *B. burgdorferi* sensu lato im Juni mit der größten Durchseuchungsrate und sogar doppelt so häufig wie im Mai nachgewiesen werden konnte. Kampen et al. (2004) dokumentierten außerdem die zeitliche Veränderung der Prävalenzen von *B. burgdorferi* sensu lato in *I. ricinus* Zecken aus dem Siebengebirge. Beim Vergleich der Daten über einen Zeitraum von zehn Jahren, zeigte sich eine Erhöhung der Befallsrate. Als mögliche Ursachen wurden ökologische und klimatische Veränderungen, sowie der Einfluss von Wildtier-Management auf das Wirtstierspektrum vermutet.

Für Europa und die USA wurde eine Wahrscheinlichkeit von 1-5% errechnet nach einem Zeckenstich an Lyme Borreliose zu erkranken bei (Paul und Ackermann, 1986).

2.3.2.3 Prävalenz der Genospezies von *B. burgdorferi sensu lato*

Das Verteilungsmuster der einzelnen *B. burgdorferi sensu lato* spp. ist innerhalb von Europa recht unterschiedlich, wobei sich die dokumentierten Prävalenzen immer auf einzelne ausgewählte untersuchte Gebiete eines Landes beziehen. So wurde für *B. afzelii* häufig eine hohe Prävalenz für *I. ricinus* Zecken in ausgewählten Gebieten in Finnland (Juntilla et al., 1999), Schweden (Fraenkel et al., 2002) oder in der Schweiz (Casati et al., 2004) ermittelt. Dagegen waren in Irland *I. ricinus* Zecken am häufigsten mit *B. valaisiana* (Kirstein et al., 1997) und in Italien mit *B. burgdorferi sensu stricto* infiziert (Cinco et al., 1998). Neben diesen humanpathogenen Borrelien wurden auch bisher als apathogen geltende Spezies beschrieben. *B. lusitaniae* wurde in *I. ricinus* aus der Schweiz (Casati et al., 2004) und ein Borrelien Stamm der *B. miyamotoi*, einer Spezies, die dieser sehr ähnlich war und bislang vorwiegend in Asien beschrieben wurde, in Schweden gefunden (Fraenkel et al., 2002).

Über die Verteilung der einzelnen Genospezies von *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Deutschland gibt es bisher noch keine flächendeckenden Daten. Kampen et al. (2004) fanden bei 43,1% untersuchter *I. ricinus* aus dem Siebengebirge bei Bonn eine Infektion mit *B. valaisiana*, bei 32,3 % *B. garinii*, bei 12,3 % *B. afzelii* und bei 1,5 % *B. burgdorferi sensu stricto*. In Süddeutschland wurde bei einer Prävalenzstudie von Rauter et al. (2002) in Konstanz die höchste Infektionsrate für *B. afzelii* mit 53% ermittelt, während die Befallsraten für *B. garinii* bei 18%, für *B. burgdorferi sensu stricto* bei 11% und für die neue *B. burgdorferi sensu lato*-Spezies A14S bei 0,8% lagen. Bei insgesamt 18% der positiven Zecken konnten Mischinfektionen von *B. afzelii* und *B. garinii* bzw. *B. afzelii* und *B. burgdorferi sensu stricto* detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde von Michel et al. (2003) im Raum München und Bad Tölz die höchste Infektionsrate für *B. garinii* mit 61% ermittelt, gefolgt von *B. afzelii* mit 25%, *B. burgdorferi sensu stricto* mit 11%. Zusätzlich wurde in drei der untersuchten Zecken A14S gefunden. Bei Betrachtung der *B. garinii* OspA-Typen ergab sich folgendes Verteilungsmuster: OspA-Typ 6 war mit 32% am häufigsten, gefolgt von OspA Typ2 mit 25%, OspA Typ4 mit 22% und OspA-Typ 1 mit 11%. OspA-Typ 5 und 3 waren mit 6 und 1% seltener, während OspA-Typ 7 und *B. lusitaniae* nicht nachgewiesen werden konnten. Michel et al. (2003) konnten zudem in Bezug auf die Gebiete in denen die Zecken gesammelt wurden, eine fokale Dominanz bestimmter OspA-Typen beobachten. Bestimmte OspA-Typen scheinen demnach häufiger als andere in *I. ricinus* vorhanden zu sein. Es scheint, dass zumindest nach Kultivierung

Unterschiede in der Isolationshäufigkeit der verschiedenen *B. burgdorferi* sensu lato-Spezies aus Patientenmaterial und Zecken derselben endemischen Region bestehen (Picken et al., 1996).

In Europa konnte *B. garinii* OspA-Typ 4 aus Zerebrospinalflüssigkeit, aber bislang nicht aus *I. ricinus* kultiviert werden (Wilske et al., 1993, 1996a). Obwohl Sequenzen von OspA-Typ 4 bereits in gesammelten Zecken detektiert wurden (Eiffert et al., 1995), wird vermutet, dass die Anzahl dieses *B. garinii* Serotyps in Zecken einfach geringer ist oder OspA-Typ 4 bei Mischinfektion in Kulturen von anderen OspA-Typen überwachsen wird (Hu et al., 2001). Solche Mischinfektionen verschiedener Genospezies werden häufig mit einer Prävalenz bis zu 32 %, beschrieben, und sind für die Form der klinischen Manifestation einer Lyme Borreliose von Bedeutung (siehe Kap. 2.1.1.4) (Cinco et al., 1998; Kampen et al., 2004; Kirstein et al., 1997; Liebisch et al., 1998; Michel et al., 2003; Postic et al., 1997; Rijpkema et al., 1996 a).

2.3.2.4 Prävalenzen von gesaugten *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato

Um die unmittelbare Gefahr, durch einen Zeckenstich mit *B. burgdorferi* sensu lato infiziert zu werden, besser abschätzen zu können, wurden mittlerweile auch Prävalenzstudien an von Menschen oder Tieren abgesammelten gesaugten Zecken durchgeführt. Dabei ermittelten Hubálek et al. (2004) für vom Menschen abgesammelte weibliche *I. ricinus* Zecken aus der Tschechischen Republik eine Prävalenz von 20%. Liebisch et al. (1998) fanden in einer Studie in Norddeutschland weniger als 10% und Fingerle et al. (1998) in einer entsprechenden Studie in Süddeutschland 36,6% *B. burgdorferi* sensu lato infizierte, von Menschen abgesammelte Zecken. Die letztgenannte Prävalenz lag dabei höher als Durchseuchungsraten von nüchternen Zecken aus derselben Region in Süddeutschland (siehe Kap. 2.3.2.2). Dieses Ergebnis wurde damit erklärt, dass ein Blutkontakt zu einer Vermehrung der Borrelien im Mitteldarm der Zecke führt. So konnten de Silva und Fikrig (1995) in einem Mäusemodell zeigen, dass die Blutmahlzeit der Zecke die Vermehrung von *B. burgdorferi* im Mitteldarm und die Disseminierung der Spirochäten in die Speicheldrüsen stimulierte. Wie bei nüchternen Zecken (siehe Kap.2.3.2.3) konnten Fingerle et al. (1998) und Hubálek et al. (2004) auch bei gesaugten Zecken eine höhere Durchseuchungsrate bei adulten Stadien als bei Nymphen feststellen.

Matuschka et al. (1993) fanden in Brandenburg bei etwa einem Fünftel der untersuchten nüchternen Zecken eine Infektion mit *B. burgdorferi* sensu lato, während der Erreger bei gesaugten Zecken von Rehen nur ganz vereinzelt nachgewiesen werden konnte. Als Ursache wurde vermutet, dass das Blutsaugen von noch nicht infizierten Zecken an Ungulaten eine Aufnahme von *B. burgdorferi* sensu lato verhindern, oder eine bereits bestehende Infektion eliminieren könnte (siehe Kap. 2.3.2.1). Ähnliche Unterschiede zwischen den Durchseuchungsraten beschrieben auch Baumgarten et al. (1999) für nüchterne und gesaugte Zecken von Hunden aus Baden-Württemberg. Rijpkema et al. (1996b) konnten dagegen bei 31 % noch ungesogener als auch bei 23 % gesaugter, von Rehen abgeernteter, Zecken eine Infektion mit Borrelien nachweisen. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Antikörpern und einer Infektion von *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* sensu lato beobachtet werden, da *Borrelia* infizierte Zecken sowohl bei serokonvertierten wie auch bei seronegativen Tieren gefunden wurden.

2.3.3 *A. phagocytophilum*

2.3.3.1 Infektionsspektrum

Das Infektionsspektrum von *A. phagocytophilum* umfasst zahlreiche Haus-, Nutz- und Wildtierarten. So konnten in seroepidemiologischen und molekulargenetischen Studien Infektionen von Hunden (Greig et al., 1996; Olsson Engvall et al., 1996; Pusterla et al., 1997; Pusterla et al., 1998c; Tozon et al., 2003; Manna et al., 2004), Pferden (Johansson et al., 1995; Madigan et al., 1995; Madigan et al., 1996; Munderloh et al., 1996; Olsson Engvall et al., 1996; Gerhards et al., 1987; von Loewenich et al., 2003a), und Wiederkäuern (Pfister et al., 1987; Olsson Engvall et al., 1996; Pusterla et al., 1998a; Stuen et al., 2002; Hoffmann-Lehmann et al., 2004) nachgewiesen werden.

Aber auch beim Menschen wurden definierte Fälle von granulozytärer Ehrlichiose in den USA (Bakken et al., 1994; Chen et al., 1994; Goodman et al., 1996) und in Europa (Petrovec et al., 1997) dokumentiert. Zwar sind bisher keine durch Erregernachweis gesicherten *A. phagocytophilum* Infektionen des Menschen in Deutschland beschrieben worden, doch ist deren Vorkommen wahrscheinlich (Fingerle et al., 1997; von Loewenich et al., 2003b). Dies wird begründet durch den Nachweis dieses Erregers in *I. ricinus* Zecken aus verschiedenen deutschen Regionen (Kap.2.3.3.3) sowie durch die Tatsache,

dass Hochrisikopersonen für Zeckenstiche häufiger gegen *A. phagocytophilum* gerichtete Antikörper als die Normalbevölkerung aufwiesen. So konnten Fingerle et al. (1997) bei einer serologischen Studie in Süddeutschland bei Forstarbeitern häufig höhere Antikörpertiter gegen *A. phagocytophilum* nachweisen als bei Personengruppen derselben Region, die keinem starken Zeckenbefall ausgesetzt waren. Auch Oehme et al. (2002) konnten bei Waldarbeitern in Baden-Württemberg, in regionaler Abhängigkeit, bei 5% bis 16% positive Antikörpertiter gegen *A. phagocytophilum* nachweisen.

2.3.3.2 Wirtstiere, Reservoir

Inwiefern bestimmte Tierarten als Erregerreservoir dienen, ist noch nicht vollständig geklärt. In den USA gelten kleinere wildlebende Säugetiere wie die Weisfuß-Hirschmaus (*Peromyscus leucopus*) und Weißwedelhirsche (*Odocoileus virginianus*) als natürliches Reservoir für granulozytäre Ehrlichien (Munderloh et al., 2003).

Auch in Europa weisen verschiedene Studien zumindest auf einen häufigen Kontakt von Wildtieren mit *A. phagocytophilum* hin. In der Schweiz konnten Liz et al. (2000) in 10% untersuchter Blut- und Gewebeprobe von Nagetieren DNA von *A. phagocytophilum* detektieren, wobei die Infektionsrate bei Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) mit 19,2% wesentlich höher als in allen anderen untersuchten Tieren war. Liz et al. (2002) fanden außerdem bei 60,9% der untersuchten Rehe (*Capreolus capreolus*) und 28,2% der Gemsen (*Rupicapra rupicapra*) eine Serokonversion und konnten bei 18,4% der Rehe *A. phagocytophilum* mittels PCR nachweisen. Oporto et al. (2003) detektierten in einer Region in Spanien bei 38% untersuchter Rehe eine Infektion mit *A. phagocytophilum*. Auch in Österreich und der Tschechischen Republik konnten in 74% (Petrovec et al., 2003) bzw. 32% bis 40% (Petrovec et al., 2003; Polin et al., 2004) untersuchter Rehe und in 25% bzw. 14,3% untersuchter Füchse und Wildschweine eine Infektion mit *A. phagocytophilum* nachgewiesen werden. Neben den punktuellen Prävalenzen beobachteten Polin et al. (2004) zudem noch eine Veränderung der Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in Rehen über einen längeren Zeitraum, wobei die höchsten Werte im Spätsommer und Winter ermittelt werden konnten.

Aufgrund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass auch in Europa Wildtiere eine Funktion als natürliches Reservoir für granulozytäre Ehrlichien haben könnten. Im Gegensatz zu Borrelien scheint dies aber nicht so sehr für Nagetiere, sondern eher für

größere Wildtiere wie Rehe zu gelten. Dafür sprechen auch die unterschiedlichen Befallsraten der verschiedenen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* (siehe Kap.2.3.3.3).

2.3.3.3 Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*

Innerhalb von Deutschland wurden bisher ähnliche Prävalenzen für *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* Zecken von 2,3% in Thüringen (Hildebrandt et al., 2003), 2,2% bzw. 1% in Baden-Württemberg (Baumgarten et al., 1999; Hartelt et al., 2003) und von 1,6% aus München (Fingerle et al., 1999a) ermittelt. Dabei wiesen die Infektionsraten auf eine fokale Verbreitung von *A. phagocytophilum* hin. So fanden Fingerle et al. (1999a) in Bayern aus fünf verschiedenen Gebieten nur in adulten Zecken vom Englischen Garten eine Infektion mit *A. phagocytophilum* mit einer Durchseuchungsrate von 2,6%. Regionale Schwankungen der Prävalenzraten zwischen 0-3,8% wurden auch von Hildebrandt et al. (2002) bei Zecken aus Thüringen beschrieben, wobei Infektionen von *I. ricinus* mit *A. phagocytophilum* in nur einem von drei Sammelbezirken nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren fiel auf, dass bei der Studie in Bayern nur adulte Zecken, aber keine Nymphen infiziert waren, und in der Studie in Thüringen konnten für adulte Zecken mit 6,5% eine signifikant höhere Infektionsrate als für Nymphen mit 1,2% ermittelt werden. Ähnliche Unterschiede in den Infektionsraten von *A. phagocytophilum* bei den verschiedenen Zeckenstadien wurden auch aus anderen europäischen Ländern wie der Schweiz und England beschrieben (Pusterla et al., 1998b; Ogden et al., 1998).

In Österreich, wo Prävalenzen von 5,1% (Sixl et al., 2003) bis 8,7% (Polin et al., 2004) für *A. phagocytophilum* dokumentiert wurden, konnte zudem eine saisonale Schwankung der Durchseuchungsraten beobachtet werden (Polin et al., 2004).

Während aus südosteuropäischen Ländern wie Bulgarien allgemein sehr hohe Prävalenzen von bis zu 34% dokumentiert wurden (Christova et al., 2001; Sréter et al., 2004), traten in anderen mittel- bzw. nordeuropäischen Ländern wie Schweden große regionale Schwankungen der Durchseuchungsraten zwischen 3,1% und 9,2% auf (von Stedingk et al., 1997). Diese Differenzen in den Prävalenzen sind vermutlich von Faktoren wie der lokalen Zeckenpopulation, die einerseits von klimatischen Faktoren und andererseits durch die Verfügbarkeit geeigneter Reservoir- und Wirtstiere beeinflusst wird (siehe Kap.2.2.2), abhängig (Fingerle et al., 1999a).

Für Zecken, die bereits Blut an Wirtstieren gesaugt hatten, konnten häufig höhere Prävalenzen für *A. phagocytophilum* als bei nüchternen *I. ricinus* ermittelt werden. Aus Deutschland (Baumgarten et al., 1999) bzw. den Niederlanden (Schouls et al., 1999) wurden Prävalenzen von 67% bzw. 45% bei an Rehen gesaugten Zecken dokumentiert. In einer Region der Schweiz, die als endemisch für bovine Ehrlichiose gilt, wurden für *A. phagocytophilum* Durchseuchungsraten von 0,8% in nüchternen Zecken, 4,4% in gesaugten Zecken, die von gesunden Rindern stammten, und 26,5% für gesaugte Zecken, die von an Ehrlichiose erkrankten Rindern abgesammelt wurden, ermittelt (Pusterla et al., 1998b). Die Diskrepanz der Prävalenzen resultiert vermutlich aus einer durch die Blutmahlzeit bedingten Aufnahme von Erregern, bzw. einer durch diesen Vorgang induzierten Vermehrung der Ehrlichien in der Zecke (Silva und Fikrig, 1995; Pusterla et al., 1998b).

Ogden et al. (2003) bestätigten diese Annahme, da sie für Zecken, die an experimentell infizierten Schafen Blut gesaugt hatten, im Vergleich zu gesaugten Zecken, die von gesunden Tieren stammten, eine zehnfache Zunahme der Durchseuchungsrate ermitteln konnten. Diese Beobachtung führte außerdem zu der Annahme, dass Wiederkäuer während der akuten und post-akuten Phase einer Infektion mit *A. phagocytophilum* ein effizientes Erregerreservoir darstellen.

2.3.4 *B. divergens*, *B. microti*

2.3.4.1 Infektionsspektrum, Wirtstiere, Reservoir

Das Wirtsspektrum von *B. microti* reicht von Kleinsäugetern (Brandt et al., 1977; Etkind et al., 1980), bestimmten Primaten (Moore und Kuntz, 1981) bis hin zum Menschen. Bei *B. divergens* umfasst es Rinder, Nager und den Menschen (Homer et al., 2000; Zintl et al., 2003).

In Deutschland konnte die Erdmaus (*Microtus agrestis*) als natürlicher Wirbelwirt für *B. microti* nachgewiesen werden. Nach Walter und Weber (1981) scheint die Aufrechterhaltung und Ausbreitung von *B. microti*-Herden vor allem an hohe Populationsdichten von Erdmäusen bzw. an vektorkompetenten *Ixodes*-Arten gebunden zu sein. Krampitz und Bäumler konnten 1978 im bayerischen Alpenvorlandgebiet (Grafrath) bei 38% untersuchter Erdmäuse eine Infektion mit *B. microti* detektieren. Die

Befallsintensität der Wirtspopulation zeigte, entsprechend der saisonalen Aktivität des Vektors, im Juni mit 71% einen Höhepunkt und um die Jahreswende ein Minimum mit 7%.

Aber auch in anderen Nagern, wie der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) und der Gelbnackermaus (*Apodemus flavicollis*), konnte *B. microti* nachgewiesen werden (Duh et al., 2003; Walter und Liebisch, 1980). Dabei konnten bei Rötelmäusen die höchsten Infektionsraten in den Monaten Januar bis März und Juli bis August ermittelt werden (Walter und Liebisch, 1980).

In den USA, wo *I. scapularis* als wichtigster Vektor gilt, scheint das Nymphenstadium dieser Zecken und dessen Interaktion mit *Peromyscus leucopus* essentiell für die Aufrechterhaltung von *B. microti*. In manchen Regionen der USA (Nantucket Island), wo Babesiose endemisch ist, waren bis zu 40% der primär an *Peromyscus leucopus* parasitierenden Nymphen und bis zu 40% dieser Mäuse mit dem Erreger infiziert (Homer et al., 2000). Da in Menschen und Wildtieren die gleichen *B. microti*-Isolate nachgewiesen werden konnten (Etkind et al., 1980; Kjemtrup et al., 2000), wird außer für Nager auch für große Ungulaten (*Odocoileus hemionus*) eine Reservoirfunktion für humane Piroplasmen-Infektionen vermutet.

2.3.4.2 Humane Babesiose, Epidemiologie

In den USA ist *B. microti* ein Parasit von Kleinsäugetern, seit 1969 bei über 300 Fällen als Erreger von humaner Babesiose beschrieben worden. Dabei zeigten die Infektionen einen milden bis schweren Krankheitsverlauf, auch in nicht splenektomierten Patienten (siehe Kap. 2.1.3.7). Eine neuerdings beschriebene Babesie, WA1-Typ, konnte aus Isolaten von großen Ungulaten in Kalifornien und als Erreger einiger Babesiosefälle von Menschen isoliert werden. Ein weiterer *B. divergens*-ähnlicher Parasit konnte als Ursache einer fatalen humanen Babesiose in Missouri nachgewiesen werden (Kjemtrup und Conrad, 2000).

In Europa wurden Infektionen mit *B. divergens* aus Schweden, Großbritannien, Irland, der Schweiz, Frankreich, Spanien, dem ehemaligen Jugoslawien, der ehemaligen UdSSR und neuerdings auch aus Portugal berichtet (Gorenflot et al., 1998; Centeno-Lima et al., 2003). Die in Europa bisher nur etwa 30 registrierten Fälle humaner Babesiose traten fast ausschließlich bei splenektomierten Menschen auf, wobei etwa ein Drittel dieser Fälle

tödlich verlief (Gorenflot et al., 1998). Die Erkrankungen konnten meisten auf eine Infektion mit *B. divergens* und seltener *B. microti* zurückgeführt werden und traten meistens, entsprechend der Zeckenaktivität, zwischen den Monaten Mai und Oktober auf (Gorenflot et al., 1998; Homer et al., 2000; Zintl et al., 2003; Eckert et al., 2005). Die allgemein niedrige Inzidenz hängt möglicherweise mit der mangelhaften Dokumentation, aufgrund von Verwechslungen und Fehldiagnosen, beispielsweise im Frühstadium mit Malaria, zusammen (Zintl et al., 2003; Eckert et al., 2005).

Seroprävalenzstudien weisen aber darauf hin, dass bei Menschen in Deutschland Babesien-Infektionen häufiger als bisher angenommen, auftreten. Hunfeld et al (2002) konnten bei 11,5% untersuchter Zecken exponierter Personen eine Serokonversion feststellen und bei 5,4% bzw. 3,6% eine Infektion mit *B. microti* bzw. *B. divergens* nachweisen.

2.3.4.3 Bovine Babesiose, Epidemiologie

Zur Inzidenz der bovinen Babesiose in Europa ist bisher wenig bekannt, für Österreich werden ca. 1000, für Irland ca. 120 000 Fälle im Jahr angegeben (Eckert et al., 2005). Dabei ist *B. divergens* von regionaler Bedeutung. Babesioseausbrüche ereignen sich auf bestimmten Weiden einzelner Bestände oder in größeren Gebieten, wie beispielsweise Gebirgstälern. Jährliche Erkrankungsausbrüche sind auf stabile Habitate der Zecken zurückzuführen, Ausbrüche in mehrjährigen Intervallen dagegen auf temporäre Habitate (Zintl et al., 2003; Eckert et al., 2005).

Bei Weidetieren werden im Mai und Juni sowie im September und Oktober, und selten in anderen Phasen der Weideperiode, Babesioseausbrüche beobachtet (siehe Kap. 2.2.5). Bei diesen Tieren kann sich eine infektionsgebundene Immunität entwickeln, die dann gebildet wird, wenn sich die Rinder bis zu einem Alter von etwa 9 Monaten infizieren. In dieser Altersphase können sich die Tiere zwar infizieren, aber nicht erkranken. Stellt sich eine endemische Stabilität ein, ist die Häufigkeit von Weideausbrüchen gering. Zu Erkrankungen kommt es, wenn Jungtiere zeckenfrei aufwachsen und erst im Alter von über neun Monaten von infizierten Zecken befallen werden. In hochendemischen Gebieten können die Tiere durch einen fast ununterbrochen vorhandenen Infektionsdruck eine Präimmunität entwickeln, die zwar nicht vor erneuten Infektionen, aber vor Erkrankung schützt (Eckert et al., 2005).

2.3.4.4 Prävalenzen von *B. microti* und *B. divergens* in *I. ricinus*

Bisher wurden nur vereinzelt Prävalenzdaten von *B. microti* und *B. divergens* in *I. ricinus* dokumentiert. In einer umfassenden epidemiologischen Studie in Süddeutschland konnte bei 1% untersuchter *I. ricinus* Zecken eine Infektion mit *Babesia* spp. detektiert werden, wobei 90% als *B. divergens* und 10% als *B. microti* identifiziert wurden (Hartelt et al., 2003). Im Vergleich dazu konnte in Slovenien eine Durchseuchungsrate von 7,5% für *B. microti* ermittelt werden (Duh et al., 2001). Sehr hohe Prävalenzen von 16,3% wurden für *Babesia* spp. in Polen beschrieben, wobei *B. microti* mit 13,3% im Vergleich zu *B. divergens* mit 3% die dominierende Spezies war und am häufigsten adulte Zecken infiziert waren (Skotarczak und Cichocka, 2001).

2.3.5 Koinfektionen

Ixodes Zecken können durch ihr breites Wirtsspektrum verschiedene Arten von Erregern aufnehmen und diese beherbergen. So können in diesen Zecken regelmäßig Koinfektionen mit verschiedenen Erregern detektiert werden. Häufiger treten Mehrfachinfektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. und seltener auch mit *B. microti*, *B. divergens* und *Bartonella* spp. auf (Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999a; Leutenegger et al., 1999; Schouls et al., 1999; Derdákóvá et al., 2003; Hartelt et al., 2003; Adelson et al., 2004).

Neben dem simultanen Nachweis verschiedener pathogener Erreger im Vektor *I. ricinus*, weisen seroepidemiologische Studien darauf hin, dass Menschen und Tiere gleichzeitig mit verschiedenen Zecken-übertragenen Erregern infiziert sein können. So konnten beispielsweise in Prävalenzstudien an Lyme Borreliose Patienten häufig die Koexistenz von Antikörper gegen *A. phagocytophilum*, FSME und manchmal auch *Babesia* spp. nachgewiesen werden (Mitchell et al., 1996; Hunfeld et al., 1998; Hunfeld und Brade, 1999; Christova et al., 2001; Oehme et al., 2002; Hermanowska-Szpakowicz et al., 2004). In solchen derartigen Studien konnte in der Schweiz (Weber et al., 2000) bei 25% von Patienten, die Antikörper gegen *B. burgdorferi* sensu lato oder FSME aufwiesen, zusätzlich Antikörper gegen *A. phagocytophilum* detektiert werden. Auch in Süddeutschland (Fingerle et al., 1997) konnten bei 11,4% und im Rhein-Maingebiet (Hunfeld und Brade, 1999) bei 5,5% untersuchter Borreliose Patienten Antikörper gegen *A.*

phagocytophilum nachgewiesen werden. Zudem beobachteten Hunfeld et al. (1998), dass die Seroprävalenzraten für *A. phagocytophilum* -, FSME- und *B. microti*- Antikörper bei Patienten mit Lyme Borreliose und bei asymptomatischen Individuen mit positiver Borrelienserologie signifikant höher waren als in einer Kontrollgruppe von Blutspendern der selben Region, die keine Antikörper gegen *B. burgdorferi* sensu lato aufwiesen (Hunfeld et al., 1998). Insgesamt trat eine Serokonversion gegen einen oder mehrere dieser Erreger häufiger bei Menschen mit einer Zeckenstich-Anamnese auf (Hunfeld und Brade, 1999). Außer dem serologischen Nachweis gelang mittlerweile auch der direkte Erregernachweis von Koinfektionen in Patienten mit einer Zeckenstich-Anamnese. Hermanowska-Szpakowicz et al. (2004) konnten in 10,42% der Blutproben von bestätigten Lyme Borreliose- oder FSME- Patienten oder Menschen, bei denen ein Verdacht auf die letztgenannten Erkrankungen bestand, DNA von *A. phagocytophilum* detektieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass für stark Zecken-exponierte Menschen und Tiere ein Risiko besteht, bei einem Zeckenstich gleichzeitig mit verschiedenen Erregern infiziert zu werden (Fingerle et al., 1997; Kordick et al., 1999). Solche Simultaninfektionen können zu einer untypischen klinischen Symptomatik führen (Wilske und Fingerle, 1996c, 2000) und sollten daher bei der Diagnostik und Therapie von akuten fieberhaften Erkrankungen nach einem Zeckenstich berücksichtigt werden (Fingerle et al., 1999a, Hunfeld et al., 1998; Leutenegger et al., 1999; Christova et al., 2001).

2.4 Nachweis und Differenzierung von Zecken übertragenen Erregern in epidemiologischen Studien

2.4.1 Methoden zur Detektion von Erregern in Zecken

Zur Detektion von Zecken übertragenen Erregern wurden Verfahren wie die Dunkelfeldmikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie, Immunfluoreszenzassays (IFA), die Kultivierung und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beschrieben (Fingerle et al., 1994; Hubálek und Halouzka 1998; Sparagano et al., 1999; Kampen et al., 2004).

Beim Vergleich der Prävalenzen, die in den einzelnen Verfahren für gleiche Proben ermittelt wurden, zeigte sich, dass verschiedene Nachweismethoden unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Zum Nachweis von Zecken übertragenen Erregern gilt bisher die Kultivierung als die am wenigsten sensitive Methode. Mikroskopische Verfahren scheinen

miteinander vergleichbar, sind aber wie immunologische Methoden und die Kultivierung relativ zeitaufwendig und haben eine limitierte Spezifität (Hubálek und Halouzka, 1998; Sparagano et al., 1999).

Mit mikroskopischen und immunologischen Nachweisverfahren wurden häufiger höhere Prävalenzen als in der PCR ermittelt (Wittenbrink et al., 1994; Juntilla et al., 1999). Falsch positive Ergebnisse in der Dunkelfeldmikroskopie oder im IFA können aus einer fehlerhaften Identifikation der Erreger resultieren, während falsch negative Ergebnisse in der PCR durch eine Inhibition durch Hämoglobin in Zecken verursacht werden können. Solch eine Behinderung der Amplifikation von DNA konnte aber durch Verwendung einer geeigneten Extraktionsmethode ausgeschlossen werden (Schwartz et al., 1997; Kampen et al., 2004).

Die PCR (siehe Kap. 3.8) gilt bislang als die sensitivste Methode zur Detektion von Erregern in Zecken (Hubálek und Halouzka, 1998; Sparagano et al., 1999). Bei der Interpretation der PCR Ergebnisse bleibt allerdings zu beachten, dass im Falle eines positiven Ergebnisses ein DNA Abschnitt des Erregers, aber nicht ein lebender und infektiöser Erreger nachgewiesen wurde (Sparagano et al., 1999).

2.4.2 Detektion von *B. burgdorferi sensu lato*

Die PCR ist eine in epidemiologischen Studien oft verwendete sensitive Methode zum Nachweis von *B. burgdorferi sensu lato* in Zecken und Patienten. 1989 wurde von Rosa et al. erstmals eine PCR zur Detektion von Borrelien beschrieben. Mittlerweile existieren mehr als 100 veröffentlichte PCR-Protokolle mit unterschiedlichsten Primern und Zielgenen. Häufig verwendete Zielsequenzen stellen das *ospA*-Gen (Michel et al., 2003), das Flagellin (*fla*)-Gen (Schwaiger et al., 2001), chromosomale Gene und ribosomale Sequenzen wie 5S-23S und 16Sr-RNA dar (Schmidt, 1997).

Mittlerweile wurden auch verschiedene Real-Time PCR-Protokolle zur Detektion von *B. burgdorferi sensu lato* publiziert. Zur quantitativen Detektion des *fla*-Genabschnittes entwickelten Schwaiger et al. (2001) eine Real-Time PCR, mit der alle in Europa relevanten Spezies des *B. burgdorferi sensu lato*-Komplexes erfasst werden. Pietilä et al. (2000) und Wang et al. (2003) entwickelten Protokolle, die auf der Amplifikation eines *recA*-Genabschnittes basieren. Straubinger et al. (2000) gelang mit einer *ospA*-Gen detektierenden PCR der quantitative Nachweis von *B. burgdorferi* aus klinischem

Probenmaterial von künstlich infizierten Hunden und Rauter et al. (2002) konstruierte eine auf dem *ospA*-Gen basierende Real-Time PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse (siehe Kap. 5.1.3).

2.4.3 Differenzierung von *B. burgdorferi sensu lato*

Zur Bestimmung der einzelnen Genospezies und Subtypen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Auf der Grundlage der unterschiedlichen Reaktivität mit monoklonalen Anti-OspA-Antikörpern definierten Wilske et al. (1993, 1996a) acht verschiedene OspA-Serotypen von *B. burgdorferi sensu lato* (siehe Kap. 2.1.1.4). Analog zu dieser OspA-Typisierung gibt es auch Typisierungsmöglichkeiten von OspC-Gruppen mittels monoklonaler anti-OspC-Antikörper. OspC ist aber im Vergleich zu OspA deutlich heterogener. Problematisch scheint bei der Phänotypisierung mittels monoklonaler Antikörper, dass diese Typisierungsmethode durch das variable Expressionsverhalten beeinflussbar ist (Wilske et al., 1993).

Mittlerweile wurden auch verschiedenen Methoden zur Genotypisierung von *B. burgdorferi sensu lato* beschrieben: die Puls- Feld- Gel- Elektrophorese (PFGE) (Busch et al., 1996), zufällig amplifizierte polymorphe DNA (engl.: Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) (Wang et al., 1998), PCR basierte Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) (Liveris, et al., 1995; Michel et al., 2003) und Light Cycler PCR (Pietilä et al., 2000) sind bisher publiziert worden.

Um eine zuverlässige Differenzierung der Genospezies zu erhalten, eignet sich für epidemiologische Studien an Zecken und Patientenmaterial zum einen eine Real-Time PCR mit spezies-spezifischen Sonden oder eine RFLP-Analyse des Amplifikats (Wang et al., 1999b, Rauter et al., 2002). So ermöglichte eine von Rauter et al. (2002) auf dem *ospA*-Gen basierende Real-Time PCR mit anschließender Schmelzpunktanalyse den Nachweis der drei humanpathogenen Spezies *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi sensu stricto*, wobei keine Differenzierung von *B. afzelii* und *B. valaisiana* möglich war, da beide Spezies die gleiche Schmelzpunkttemperatur haben. Dagegen beschrieben Michel et al. (2003) eine auf dem *ospA*-Gen basierende nested PCR zur Detektion von *B. burgdorferi sensu lato* mit anschließender Speziesbestimmung und OspA-Typisierung durch RFLP-Analyse. Mit dieser spezifischen Methode können alle *B. burgdorferi sensu lato* spp.,

inklusive der neuen Spezies A14S und die zugehörigen OspA-Typen 1-8 differenziert werden.

2.4.4 Detektion von *A. phagocytophilum*

Zur Detektion von *A. phagocytophilum* wurden verschiedene PCR-Protokolle entwickelt, in denen das 16Sr-RNA-, *msp2*-, *groESL*-oder *epankl*-Gen als Zielgen dienen (Massung und Slater, 2003). Um diese Methoden bewerten zu können, verglichen Massung und Slater (2003) 13 publizierte Primerpaare bezüglich ihrer analytischen Sensitivität und testeten sie mit aus *A. phagocytophilum* infizierten Zellen extrahierter DNA. Die Methoden mit dem niedrigsten Detektionslimit waren nested PCRs, die das 16S ribosomale RNA-Gen als Zielsequenz hatten (Massung et al., 1998), eine konventionelle und eine Real-Time PCR, die das 16S ribosomale RNA-Gen bzw. das *msp2*-Gen (Courtney et al., 2004) amplifizierten. Die Überprüfung der Spezifität dieser PCRs erfolgte mit *R. rickettsii*, *B. henselae*, *E. chaffeensis*, wobei keine Kreuzreaktionen auftraten. Die PCRs wurden außerdem erfolgreich an infiziertem Blut von Haus- und Wildtieren und an aus *I. scapularis* extrahierter DNA getestet. Aufgrund dieser hohen Sensitivität und Spezifität wurden die konventionelle und die nested PCR, die auf einem Nachweis des 16S-rRNA-Gens beruhen und die Real-Time PCR, in welcher das *msp2*-Gen amplifiziert wird, zur Detektion von *A. phagocytophila* in klinischem Material und *Ixodes* Zecken empfohlen (Massung und Slater, 2003).

Ein weiteres Real-Time PCR-Protokoll mit dem 16Sr-RNA-Gen als Target wurde 1999 von Pusterla et al. publiziert. Dieses PCR ermöglichte ebenfalls den Nachweis von *A. phagocytophilum* aus infiziertem Blut und *I. ricinus* Zecken.

Für einen Nachweis von *A. phagocytophila* in Zecken bieten sich also mittlerweile neben den beschriebenen konventionellen und nested PCR's auch Real-Time PCR's an, die sich aber in ihrer Zielsequenz unterscheiden. Während das 16Sr-RNA-Gen in verschiedenen *Anaplasma*-Spezies vorkommt, codiert das *msp2*-Gen von *A. phagocytophilum* ein 44 KDa immundominantes Oberflächenprotein (engl. outer membrane protein), welches vermutlich spezifisch für *Anaplasma* spp. ist und somit eine größere Spezifität erlaubt (Massung und Slater, 2003).

2.4.5 Detektion von *Babesia* spp.

Bisher wurden zum Nachweis von Babesien in Zecken PCRs angewandt, die das 18Sr-DNA-Gen amplifizierten. Zur weiteren Speziesdifferenzierung musste das Amplifikat i. d. Regel sequenziert oder mit spezifischen Restriktionsenzymen analysiert werden (Hartelt et al., 2003; Devos und Geysen, 2004; Zahler et al., 2000).

Eine direkte Differenzierung wurde durch die Verwendung *B. divergens*- und *B. microti*-spezifischer Primer ermöglicht (Conrad et al., 1992; Persing et al., 1992).

Eine Real-Time PCR mit *Babesia* spp.-spezifischen Sonden wurde bisher noch nicht beschrieben. Zahler-Rinder (nicht veröffentlicht) entwickelte eine Real-Time PCR zur Detektion des 18Sr-DNA-Gens von Piroplasmen und Hepatozoon, welche somit auch *Babesia* spp. erfasst.

3 Material und Methoden

3.1 Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits

High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

TA Cloning Kit, Version T (Invitrogen, Karlsruhe)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim; ROTH, Karlsruhe; Fermentas, Life Sciences, Leonrot)

MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Primer: V1a, V1b, V2a, V2b, V3a, V3b, R1, R37, Beta-Act.1, Beta-Act.2, ge3a, ge10r, ge9f, ge2 (Metabion, Mannheim)

FlaF1A, FlaR1 (TIB MOLBIOL, Berlin)

PIR2, PIR3, PIR 19, PIR 20, Ep145f, Ep50r (Thermo Electron GmbH, Ulm)

ApMSP2f, ApMSP2r (biomers.net)

FlaProbe1 (TIB MOLBIOL, Berlin)

PIR-S-1, SEp80p (Thermo Electron GmbH, Ulm)

ApMSP2p-Hex (biomers.net)

Probenauftragspuffer: Orange Loading Dye (Fermentas, Life Sciences, Leonrot)

DNA Längenstandard: 50 µl Molecular weight marker VIII (Boehringer, Mannheim GmbH)

O'GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas, Life Sciences, Leonrot)

3.2 Enzyme

Ampli*Taq* Gold Polymerase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

HotStar*Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Hilden)

QIAamp®DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden)

*Ssp*I (MBI Fermentas, Lithuania)

*Sfu*I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

*Bgl*III (Invitrogen, Karlsruhe)

*Kpn*21 (MBI Fermentas, Lithuania)

HindIII (Invitrogen, Karlsruhe)

3.3 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

10x TAE-Puffer 40 mM Tris
 20 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA
 mit konzentrierter Essigsäure (Eisessig) auf pH 8,3
 eingestellt

PBS-Puffer 10,7 mM MgCl₂ (Merck, Darmstadt)
 135 mM NaCl (Merck, Darmstadt)
 15 mM K₂HPO₄ x 3 x H₂O (Merck, Darmstadt)
 2,8mM KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)
 ad 1000 ml mit *Aqua dest.* lösen

Ethidiumbromid-Färbebad: 1:1000 Verdünnung der Ethidiumbromid-Stammlösung
(Endkonzentration von 10µg/ml)

3.4 Nährmedien

Luria-Bertani-Nährmedium (LB) für *E. coli*

LB-Grundmedium 5 g NaCl
 10 g Bactotrypton
 5 g Yeast Extrakt
 ad 1000 ml *Aqua dest.*
 mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
 Medium wurde autoklaviert (20 Minuten, 1 bar)

LB-Platten mit Ampicillin und X-Gal

Dem Grundmedium wurden 14-16g Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 1000 µl Ampicillin-Stammlösung (50mg/ml), 255µl IPTG (0,2M) und 600 µl X-Gal-Stammlösung (20mg/ml) auf 1000 ml LB-Medium zugegeben.

3.5 Chemikalien

Ethanol	(Merck, Darmstadt)
Tris (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan)	(Sigma, Deisenhofen)
NaAc	(Merck, Darmstadt)
EDTA	(Merck, Darmstadt)
Glycerin 87% in 20 mM EDTA	(Merck, Darmstadt)
Agarose: Seakem LE agarose	(Biozym, Diagnostik GmbH Oldendorf)
Roti®agarose	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid 10 mg/ml	(Bio Rad, München)
Agar	(Sigma, Deisenhofen)
Ampicillin	(Biomol, Hamburg)
Bactotrypton	(Becton Dickinson, Sparks, USA)
X-Gal	(Biomol, Hamburg)

3.6 Biologisches Material

3.6.1 Nüchterne Zecken

Von Frühjahr 2003 bis Sommer 2004 wurde in drei Gebieten in Süd-Bayern (Englischer Garten, Isar-Auen und Vilshofen bei Passau) 625 adulte *I. ricinus* Zecken gesammelt (Tab. 4). Das Gebiet im Englischen Garten, einem Park im Zentrum von München, ist etwa 5 ha groß mit Wiesen, Buschvegetation und einzelnen Baumgruppen. Das Habitat in den nördlichen Isar-Auen, welche ebenfalls ein Erholungsgebiet im Einzugsbereich München darstellen, ist etwa 6 ha groß und erstreckt sich mit Wiesen und Waldgebieten entlang der Isar. Das etwa 6 ha große Gebiet in Vilshofen, bei Passau, liegt an einem Waldrand in ländlicher Umgebung (Abb. 1).

Das Sammeln der Zecken erfolgte durch die Fahnenmethode (engl.: flagging). Dabei zieht man ein weißes Baumwolltuch (1x2 m) mit variierender Schlepphöhe über die Vegetation. Die am Tuch haftenden Zecken wurden mit einer Pinzette abgenommen.

Tabelle 4: Anzahl der im Englischen Garten, in den Isar-Auen und in Vilshofen gesammelten *I. ricinus* Zecken.

Sammelgebiet	weiblich	männlich	gesamt
Englischer Garten / München	88	119	207
Isar Auen / München	90	117	207
Vilshofen / Passau	162	49	211

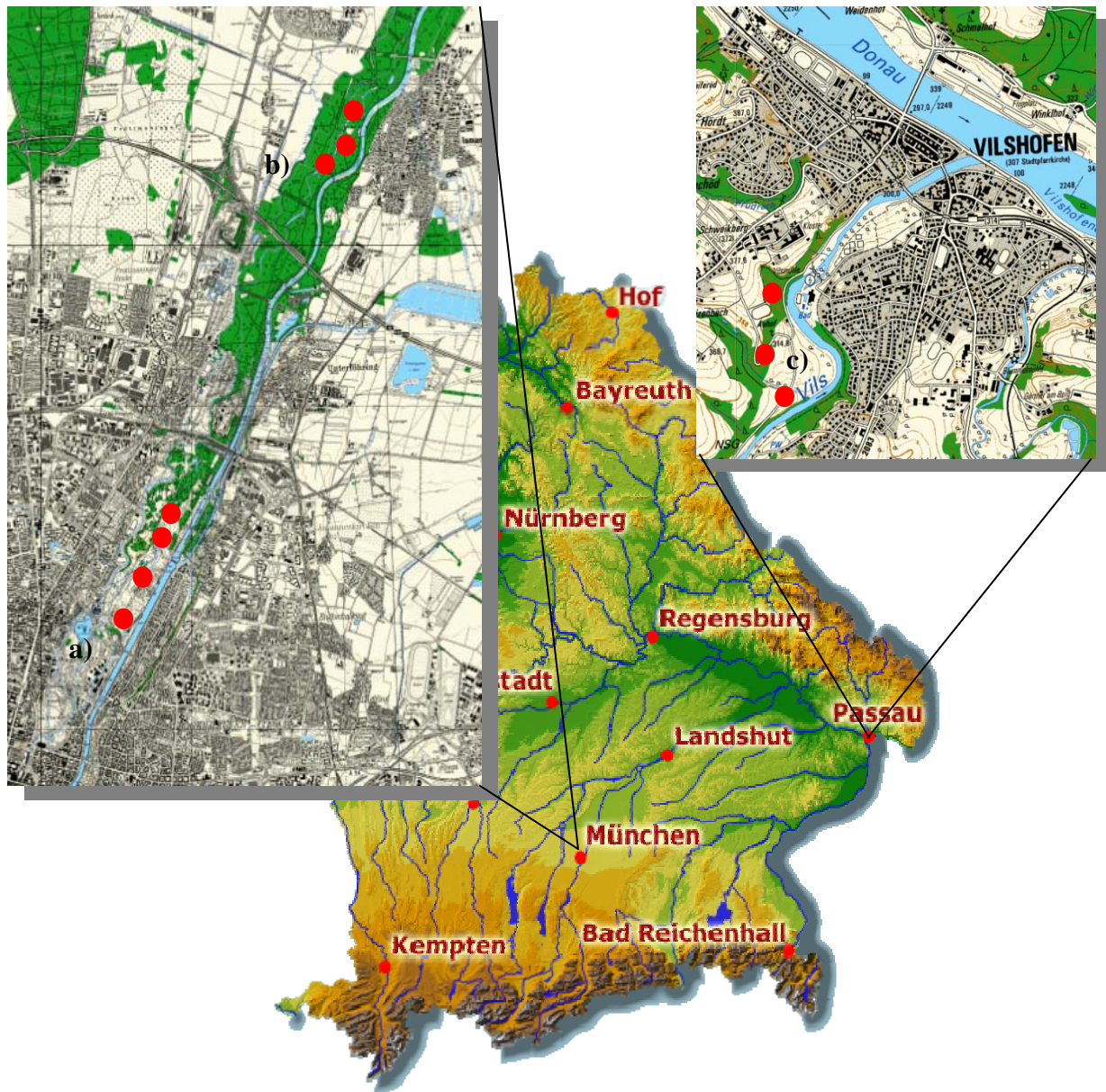


Abbildung 1: Sammelgebiete der nüchternen Zecken in a) Englischer Garten und b) Isar Auen in München und c) Vilshofen bei Passau (Quelle: MagicMaps GmbH, Bayern 3D).

3.6.2 Gesaugte Zecken

Insgesamt wurden von Frühjahr 2003 bis Sommer 2004 von Hunden aus verschiedenen Kliniken in Bayern und Baden Württemberg (Abb. 2) 275 adulte gesaugte *I. ricinus* Zecken eingesandt. Zusätzlich wurden im Spätsommer 2003 25 gesaugte Zecken von Kühen aus der Schweiz abgesammelt. Die Kühe dieses Bestands zeigten klinische

Symptome einer bovinen Ehrlichiose, und im Rahmen der Diagnostik konnte im Blutaussstrich und durch PCR eine Infektion mit *A. phagocytophilum* bestätigt werden.

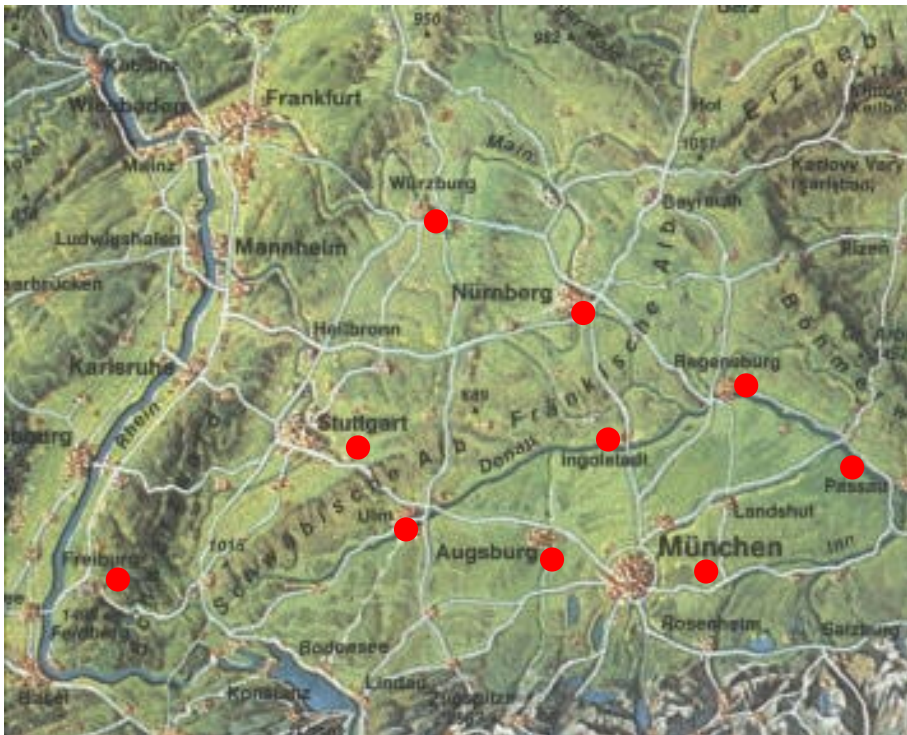


Abbildung 2: Herkunftsgebiete der von Hunden abgesammelten gesaugten Zecken in Bayern und Baden-Württemberg.

Nüchterne und gesaugte *I. ricinus* Zecken wurden anhand morphologischer Kriterien bestimmt (Hillyard, 1996) und einzeln in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -20°C eingefroren.

3.7 Prinzip der DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus Zecken erfolgte mit dem ‚QIAamp® DNA Mini Kit‘ (‚tissue protocol‘) nach Anweisungen des Herstellers (QIAGEN, Hilden). Mit dieser Technik wird die DNA nach Inkubation mit Proteinase K durch Anionen-Austausch Chromatographie gewonnen.

DNA-Extraktion aus den Zecken

Jede gefrorene Zecke wurde unter sterilen Bedingungen mit einer Skalpellklinge auf einem Objektträger zerkleinert. Die Bruchstücke je einer Zecke wurden in 180 µl ATL-Puffer aufgenommen und durch ‚vortexen‘ vermischt. Bei stark vollgesogenen Zecken wurden jeweils nur die Teile einer Zeckenhälfte pro Ansatz verwendet, um eine mechanische Behinderung der Säulenaufreinigung durch Blutkoagulate zu vermeiden.

Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (15 mg/ml) läßt man den Ansatz bei 56 °C im Wasserbad über Nacht inkubieren. Nach der Extraktion wurde die DNA von nüchternen Zecken in 200 µl und von gesaugten Zecken in insgesamt 120 µl eluiert. Bei vollgesogenen Zecken wurde die DNA jeder aufgereinigten Zeckenhälfte in 60 µl eluiert und die Eluate beider Hälften in einem 1,5 ml Eppendorfröhrchen vermischt. Die extrahierte DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.8.1 Prinzip

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnitts. Voraussetzung ist, dass die flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Bereiches bekannt sind, da diese die Zielsequenzen für die Primer darstellen. Zur Amplifikation verwendet man häufig die *Taq*-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, welches durch die hohen Reaktionstemperaturen nicht inaktiviert wird.

Die Amplifikationszyklen einer PCR bestehen aus drei Phasen: zuerst erfolgt eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C (Denaturierungsphase). Nach Abkühlung auf die Annealing-Temperatur, können die Primer mit dem jeweils komplementären Strang der nun einzelsträngigen Matrizen-DNA hybridisieren (Annealingphase). Anschließend verlängert die DNA-Polymerase bei etwa 72 °C die Primer von ihrem 3'-Ende aus entsprechend dem Komplementärstrang (Elongationsphase). Somit wird der ausgewählte DNA-Abschnitt amplifiziert. Diese drei Phasen werden in jedem Amplifikationszyklus durchlaufen und führen im Idealfall zu einer exponentiellen Zunahme des Amplifikats.

Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um eine konventionelle PCR. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich erweiterte PCR-Techniken wie die ‚nested‘- bzw. semi-nested PCR und die Real-Time PCR angewandt.

3.8.2 Semi-nested / nested PCR

Bei diesen PCR-Methoden wird nach einer Primäramplifikation ein Teil des PCR-Produkts in einem zweiten PCR-Ansatz nochmals amplifiziert. Dabei wird bei der semi-nested PCR ein flankierender Primer aus der ersten PCR-Reaktion übernommen. Der zweite Primer hybridisiert innerhalb der amplifizierten Sequenz. Bei einer nested PCR werden dagegen beide Primer so gewählt, dass sie innerhalb des Primäramplifikats hybridisieren. Dadurch wird bei beiden Verfahren die Sensitivität der DNA-Vervielfältigung erheblich gesteigert.

3.8.3 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR werden im Gegensatz zu konventionellen PCR-Methoden die Produkte nicht erst am Ende des PCR-Laufs, sondern während jedem Amplifikationszyklus durch Messung entstehender Fluoreszenz nachgewiesen. Dies erlaubt eine reale Quantifizierung der Zielsequenzen. Zudem entfällt die Gelelektrophorese, die bei der konventionellen PCR zum Nachweis des PCR-Produkts notwendig ist. Die Gefahr einer Kontamination wird durch dieses geschlossene System deutlich reduziert.

Die Detektion der PCR-Produkte kann durch DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe oder die Verwendung von spezifischen Fluoreszenzstoff-markierten Hybridisierungssonden erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Arten von Sonden verwendet: TaqMan-Sonden und Molecular Beacons. An das 3'-Ende der TaqMan Sonden und Molecular Beacons ist ein ‚Quencher-molekül‘ und an das 5'-Ende ein ‚Reportermolekül‘ gekoppelt. Liegen diese Fluorophore in der Hybridisierungssonde benachbart zueinander, wird die Energie des Fluorophors mit höherem Energieniveau auf das Fluorophor mit niedrigerem Energieniveau übertragen; es findet ein sog. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt, und die Fluoreszenz des Reportermoleküls wird zunächst unterdrückt (‚gequencht‘).

TaqMan Sonden:

Liegen nun während einer PCR spezifische Amplifikate vor, hybridisiert die einzelsträngige TaqMan Sonde mit der Target-DNA und wird durch die Taq-Polymerase (5'→3'-Exonukleaseaktivität) hydrolysiert. Hierbei werden von der Sonde kleine Fragmente abgespalten, so dass die räumliche Distanz zwischen Reporter- und Quencher-molekül zunimmt. Die Unterdrückungsfunktion des Quencher-moleküls wird aufgehoben, wodurch die Fluoreszenz des Reportermoleküls größer als die Grundfluoreszenz und damit detektierbar wird (Abb. 3). Die *Taq*-Polymerase entfaltet ihre 3'-Exonukleaseaktivität nur am Doppelstrang, so dass nichthybridisierte Sondenmoleküle unbeschadet bleiben und somit keine Fluoreszenz verursachen können.

a)



b)



c)

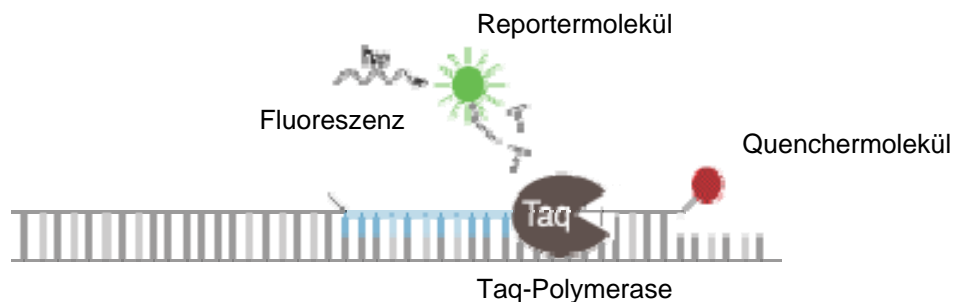


Abbildung 3: Struktur und Funktionsprinzip einer TaqMan-Sonde (modifiziert nach www.probes.com), a) Primer, TaqMan-Sonde und DNA-Zielsequenz liegen im

ungebundenen Zustand vor, b) Primer und TaqMan-Sonde hybridisieren mit der DNA-Zielsequenz, c) Abspaltung des Reportermoleküls durch die 3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wodurch eine messbare Fluoreszenz entsteht.

Molecular Beacons:

Bei Molecular Beacons ist die zum Zielstrang komplementäre Sequenz („Loop“) am 5'- und am 3'-Ende um einen selbstkomplementären Sequenzabschnitt („Stem“) mit etwa sechs Nukleotiden erweitert, wodurch die Haarnadelstruktur des Moleküls entsteht. In diesem Grundzustand bedingt der „Quencher“ durch seine räumliche Nähe zum „Reporter“ die Unterdrückung einer messbaren Fluoreszenz. Durch den Hybridisierungsvorgang an der spezifischen Zielsequenz wird diese Haarnadel-Konformation aufgelöst, und die Reporterfluoreszenz wird durch die räumliche Trennung der beiden Fluorophore messbar (Abb. 4).

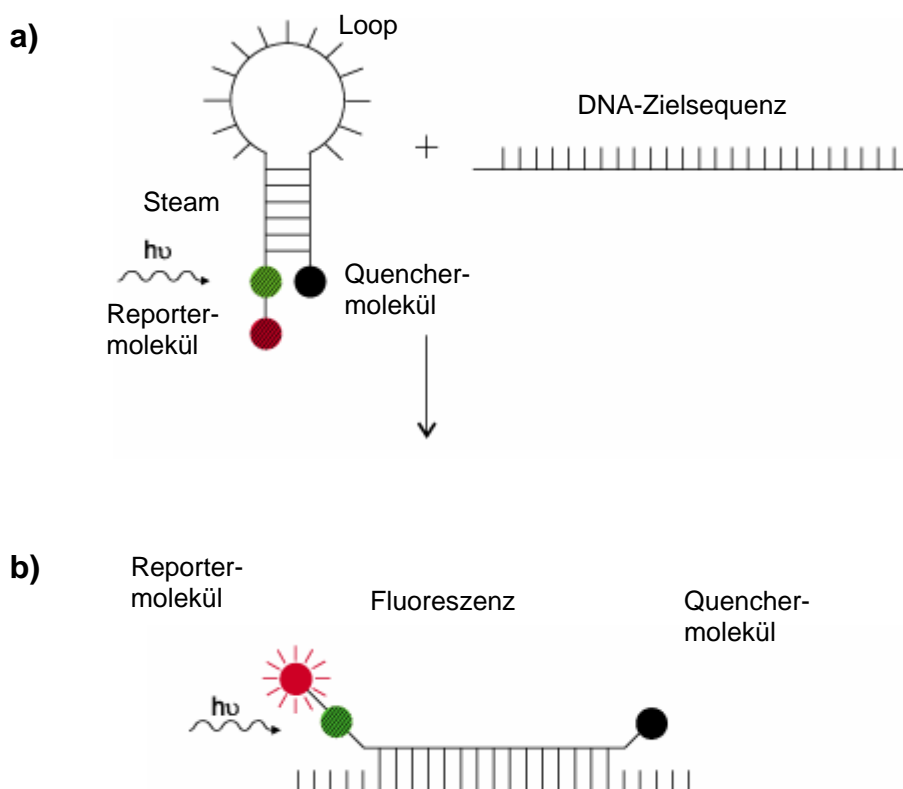


Abbildung 4: Struktur und Funktionsprinzip eines Molecular Beacons (modifiziert nach www.probes.invitrogen.com), a) Molecular Beacon in Haarnadelstruktur und DNA-Zielsequenz, b) Molecular Beacon gebunden an den Zielstrang, wobei die Haarnadelstruktur aufgehoben ist und eine Fluoreszenz messbar wird.

Die Fluoreszenzzunahme wird während jedem PCR-Zyklus gemessen und korreliert mit der gebildeten PCR-Produktmenge. Wenn die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen wird, resultiert eine Kurve mit einer initial exponentiellen, einer linearen und einer, gegen Ende der Reaktion, plateauartigen Phase (Kap. 4.1.1; Abb. 5). Die Ausgangsmengen von DNA bestimmen dabei den Zeitpunkt des exponentiellen Kurvenverlaufs.

3.9 Hydrolyse mit DNA-Restriktionsenzymen

Mit Hilfe von DNA-Restriktionsenzymen kann DNA an Sequenzen definierter Basenfolge spezifisch hydrolysiert werden. Durch die Unterschiede in der DNA-Sequenz verschiedener Organismen ergibt sich eine unterschiedliche Anzahl und Position der Restriktionsenzym-Schnittstellen und damit verschieden lange DNA-Fragmente. Dies nennt man Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Je nach Konservierung der Sequenz des untersuchten Gens ist es somit möglich, verwandte Organismen zu differenzieren und zu klassifizieren.

3.10 Agarosegel-Elektrophorese

Die analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten aus PCR und Restriktionsenzymspaltungen erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die DNA-Fragmente wurden im elektrischen Feld nach ihrer Ladung und Länge in einem, je nach Größe des Amplifikats, 0,7-2 %igen Agarosegel (0,7-2,0 g Agarose/100 ml Puffer) aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Als Vergleich diente ein mitgeführter Standard mit DNA-Fragmenten bekannter Länge.

Nach Aufkochen der Agarose in Elektrophoresepuffer (TAE Puffer) in einer Mikrowelle, wurde das Gemisch auf unter 50 °C abgekühlt und in eine Flachbett-Horizontal-Elektrophorese-Apparatur gegossen. 6-8 µl der zu analysierenden DNA wurden mit 3-4 µl Probenauftragspuffer vermischt. Nach Erstarren des Gels konnten die Proben und der Längenstandard aufgetragen und bei 10 Volt/cm Gel für ca. 60 min aufgetrennt werden. Anschließend wurde das Gel etwa 30 min lang in einem Ethidiumbromidbad (1µg Ethidiumbromid/ml) gefärbt. Das Ethidiumbromid, welches sich zwischen die Basenpaare der DNA Doppelhelix einlagert, wurde durch UV-Licht angeregt, und die dadurch sichtbar gewordenen DNA-Fragmente konnten als Banden fotografiert werden. Eine Abschätzung

der Größen und Konzentration der DNA-Fragmente erfolgte anhand des aufgetragenen Längenstandards.

3.11 Nachweis von *Borrelia* spp.

3.11.1 Real-Time PCR zur Detektion von *B. burgdorferi* sensu lato

Zum gattungsspezifischen Nachweis von Borrelien wurde eine Real-Time PCR (Schwaiger et al., 2001) ausgewählt, in der ein 170 Basenpaare-umfassender Abschnitt des chromosomalen Flagellin (*fla*)-Gens amplifiziert wird.

Die Spezifität dieser PCR erlaubt die Detektion aller in Europa klinisch relevanten *B. burgdorferi* sensu lato spp.: *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto, aber auch den Nachweis von *B. valaisiana*, einer Borrelienspezies, deren Pathogenität noch nicht geklärt ist, während keine Amplifikation von *B. lusitaniae*, *B. anderssonii*, *B. bissetii*, *B. anserina*, *B. coriaceae*, *B. hermsii*, *B. japonica*, *B. parkeri*, *B. turicatae* sowie Kreuzreaktionen mit anderen Pathogenen wie Bakterien, Viren und Pilzen möglich ist.

Diese Methode wurde daher zum ‚screenen‘ der DNA-Proben aus den Zecken verwendet. Der Forward Primer ‚FlaF1A‘ (Tab. 5), der Reverse Primer ‚FlaR1‘ (Tab. 5) und die am 5‘-ende mit FAM und am 3‘-Ende mit TAMRA markierte TaqMan-Sonde ‚FlaProbe1‘ (Tab. 5) sind dabei so konstruiert, dass mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien, mit Viren oder Pilzen ausgeschlossen werden können. Das Protokoll erlaubt, dass die oben genannten *Borrelia* spp., bzw. deren Isolate, mit einer vergleichbaren Sensitivität nachweisbar sind (Schwaiger et al., 2001).

Die PCR wurde mit 5 µl extrahierter DNA der zu untersuchenden Proben und 55 Zyklen in einem iCycler (BioRad, München) durchgeführt. Für jeden PCR-Lauf wurden als Negativkontrolle *Aqua dest.*, und als Positivkontrolle die vom Max von Pettenkofer Institut zur Verfügung gestellten *Borrelia*-Stämme PKa2 (*B. burgdorferi* sensu stricto), PKo (*B. afzelii*) und PBi (*B. garinii*) mitgeführt. Getestet wurde die extrahierte DNA der 625 nüchternen und 300 gesaugten *I. ricinus* Zecken. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tab. 6 und Tab. 7 aufgeführt.

Tabelle 5: Primer- und Sondensequenzen für die *fla*-PCR.

FlaF1A, forward primer	5'-AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A-3'
FlaR1, reverse primer	5'-GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA-3'
FlaProbe1, probe	5'-TGC TAC AAC CTC ATC TGT CAT TGT AGC ATC TTT TAT TTG-3'
Modifizierung	5'-FAM; 3'-TAMRA

Tabelle 6: Reaktionsansatz für die *fla*-PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	31,7 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5 µl	
MgCl ₂	4 µl	2 mM
FlaF1A	0,75 µl	0,3 µM
FlaR1	2,25 µl	0,9 µM
Fla-Probe1	0,5 µl	0,2 µM
dNTP's	0,4 µl	0,2mM
HotStar <i>Taq</i> Polymerase	0,4 µl	2U/Ansatz
DNA	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen für die *fla*-PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Hot-Start-Aktivierung der Polymerase	95°C	10 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	55x
Annealing-Elongation	60°C	60 sec	

3.11.2 Semi-nested PCR zur Ermittlung der *B. burgdorferi* sensu lato Spezies

Zur weiteren Differenzierung der *B. burgdorferi* sensu lato-positiven Proben in die einzelnen Spezies: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, A14S und *B. lusitaniae*, wurde in Zusammenarbeit mit dem Max-von-Pettenkofer Institut eine dort entwickelte für *B. burgdorferi* sensu lato hochspezifische semi-nested PCR mit anschließender RFLP-Analyse zur Spezies-Differenzierung und OspA-Typisierung angewandt (Michel et al., 2003). Zielsequenz ist ein etwa 800 Basenpaare großer Abschnitt des für das Oberflächenprotein OspA kodierenden Gens. Hierbei handelt es sich um eine konservierte Region dieses Gens, welches alle Spezies von *B. burgdorferi* sensu lato gleichermaßen erfasst. Andere Spirochäten wie *Treponema*, *Leptospira* und *Borrelia* außerhalb des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes wie *B. hermsii*, *B. duttoni*, *B. anserina*, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. recurrentis* und *B. litoralis* können mit dieser PCR nicht amplifiziert werden. Die Sensitivität liegt bei der Detektion von einer (alle Spezies des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes außer *B. afzelii*) bis fünf (*B. afzelii*) Borrelien.

Die erste PCR wurde mit 5 µl DNA mit den Forward Primern V1a und V1b (Tab. 8) und den Reverse Primern R1 und R37 (Tab. 9) in einem Thermocycler (Gene Amp PCR-System 2700, Applied Biosystems, Weiterstadt) mit dem in Tabelle 10 aufgeführten Reaktionsansatz und unter den in Tabelle 12 genannten Bedingungen durchgeführt. Die Negativ- und Positivkontrollen entsprechen denen der Real-Time PCR. Für die semi-nested PCR wurden 5 µl des Primäramplifikats und die Forward Primer V3a und V3b (Tab. 8) verwendet. Alle weiteren Komponenten, der Reaktionsansatz (Tab. 11) und die Reaktionsbedingungen (Tab. 12) entsprechen denen der Primäramplifikation. Das PCR-Produkt wurde auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen.

Untersucht wurde die DNA aller *fla*-PCR-positiven Proben, und zur Überprüfung der Sensitivität der Real-Time PCR noch zusätzlich 90 *fla*-PCR-negative Proben (von je 20 nüchternen Zecken pro Sammelgebiet und insgesamt 30 gesaugten Zecken).

Tabelle 8: Sequenzen der verwendeten forward primer der *ospA*-PCR.

Primäramplifikation	
V1a	5'-GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC-3'
V1b	5'-GGG GAT AGG TCT AAT ATT AGC-3'
Semi-nested PCR	
V3a	5'-GCC TTA ATA GCA TGT AAG C-3'
V3b	5'-GCC TTA ATA GCA TGC AAG C-3'

Tabelle 9: Sequenzen der verwendeten reverse primer der *ospA*-PCR.

Primäramplifikation und semi-nested PCR	
R1	5'-CAT AAA TTC TCC TTA TTT TAA AGC-3'
R37	5'-CCT TAT TTT AAA GCG GC-3'

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Primäramplifikation der *ospA*-PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	29,5 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5 µl	75 nM
V1a	0,5 µl	10 pM
V1b	0,5 µl	10 pM
R1	0,5 µl	10 pM
R37	0,5 µl	10 pM
dNTP's	8 µl	40 nM
Ampli <i>Taq</i> Gold Polymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
DNA	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die semi-nested PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	29,5 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5 µl	75 nM
V3a	0,5 µl	100 pM
V3b	0,5 µl	100 pM
R1	0,5 µl	100 pM
R37	0,5 µl	100 pM
dNTP's	8 µl	40 nM
Ampli <i>Taq</i> Gold Polymerase	0,5 µl	2,5 U/Ansatz
Primäramplifikat	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 12: Reaktionsbedingungen für die Primäramplifikation und die semi-nested PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	45 sec	30 x
Annealing	50 °C	45 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
finale Elongation	72 °C	7 min	1 x

3.11.3 RFLP-Analyse zur Differenzierung von *B. burgdorferi* sensu lato

Ziel der Restriktionsfragment-Analyse war die Differenzierung der in der Real-Time PCR detektierten *B. burgdorferi* sensu lato in die Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, der mit *B. garinii* assoziierten OspA-Typen 3-8 und von A14S. Zur Differenzierung der Borrelien wurden die Restriktionsenzyme *SspI*, *SfuI*, *BglII*, *HindIII* und *Kpn21* verwendet (Michel et al., 2003). Die resultierenden DNA-Fragmentlängen der einzelnen *Borrelia*-Stämme sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13 Theoretisches RFLP-Muster nach erfolgtem Restriktionsenzymverdau (modifiziert nach Michel et al., 2003).

Theoretisches RFLP-Muster										
Spezies	Stämme	NCBI Accession No.	OspA Sspl -Typ	Sful	Bg/II	HindIII	Kpn21			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	PKa2 ¹ , PBre ¹	X80182,	1	798	798	654/144	798			
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	CA8 ⁴	X85739	1	798	798	654/144	429/369			
<i>B. afzelii</i>	PKo ¹ , PLud ¹	S48322, X85439	2	537/261	798	798	798			
<i>B. garinii</i>	PBr ¹	X80256	3	791	758/33	791	429/362			
<i>B. garinii</i>	PBi ¹ , PTr ¹	S48323, -	4	798	556/242	798	798			
<i>B. garinii</i>	PHei ¹	X80251	5	798	798	654/144	549/195/54			
<i>B. garinii</i>	TN ¹ , PWudII ¹	X80252, X80253	6	801	801	657/144	429/252/120			
<i>B. garinii</i>	T25 ¹	X80254	7	791	758/33	585/144/62	429/185/177			
<i>B. garinii</i>	PRef ¹	X95362	7	791	758/33	647/144	429/362			
<i>B. garinii</i>		BBY10896	8			657/144	429/230/120/80			
<i>B. valaisiana</i>	VS116 ²	AF095940	801	801	801	465/336	801			
<i>B. valaisiana</i>	M53 ²	AF095947	798	798	665/133	654/144	798			
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB2 ³	Y10838	466/341	807	807	402/284/72/	807			
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB3 ³	Y10839	466/341	807	807	49	807			
<i>B. A14S</i>	A14S ⁵	AF102057	798	798	665/133	654/144	798			

¹[212], ² [195], ³ Godfroid et al unpublished, ⁴

Für die Restriktionsspaltung wurden je 6 µl des PCR-Produkts der in der *ospA*-PCR ermittelten positiven Proben (Kap. 4.1.2) eingesetzt. Dies ermöglichte die getrennte Beurteilung der Schnittmuster der einzelnen Enzyme. Die jeweiligen Ansätze (Tab. 14) wurden dann über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (*SspI*, *SfuI*, *BglIII*, *HindIII*) bzw. 55 °C im Thermoblock (*Kpn21*) inkubiert und am nächsten Tag auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen.

Da die RFLP-Schnittmuster der *B. burgdorferi* sensu lato-Stämme M53 (*B. valaisiana*) und A14S (*Borrelia* A14S) im Gel nicht zu unterscheiden sind (Kap. 4.2.2), mussten Proben mit solch einem Schnittmuster zur weiteren Differenzierung sequenziert werden.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Restriktionsspaltung.

Enzym (<i>SspI</i> , <i>SfuI</i> , <i>BglIII</i> , <i>HindIII</i> , <i>Kpn21</i>)	0,2 µl
Enzymspezifischer Puffer	2 µl
<i>Aqua dest.</i>	11,8 µl
Amplifikat	6 µl
Gesamtmenge	20 µl

3.12 Klonierung von PCR-Produkten

3.12.1 Ligation des Flagellin (*fla*)- Amplifikats in den PCRII Vektor

Da einige Proben, die in der *fla*-Real-Time PCR positiv waren, in der *ospA*-PCR nicht bestätigt werden konnten, sollte das *fla*-Amplifikat von fünf dieser Proben kloniert werden, um durch eine anschließende Sequenzierung differenziert werden zu können. Bei der Auswahl dieser Proben wurde darauf geachtet, dass eine in der *fla*-Real-Time PCR grenzwertige, zwei mittelstarke und zwei in der *fla*-Real-Time PCR stark positive Proben verwendet wurden.

50 µl des PCR-Produkts der fünf ausgewählten Proben wurden mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation des aufgereinigten Amplifikats mit dem PCRII Vektor des *TA Cloning Kits* (Invitrogen, Carlsbad, USA).

Dafür wurden 3 μl *fla*-Amplifikat, 2 μl PCRII Vektor (25 ng/ μl), 1 μl Ligationspuffer und 1 μl T4 Ligase mit *Aqua dest.* auf ein Reaktionsvolumen von insgesamt 10 μl aufgefüllt, gemischt und über Nacht bei 10°C inkubiert.

Das Amplifikat besitzt an den 3'-Enden überhängende Adeninreste, welche durch eine Matrizen-unabhängige Aktivität der *Taq*-Polymerase angehängt werden. Der zunächst linear vorliegende PCRII Vektor hat dagegen an beiden Enden überhängende Thymidinreste, die mit überhängenden Adeninbasen des PCR-Produkts hybridisieren. Der Vektor besitzt außerdem ein Resistenzgen für Ampicillin und Kanamycin und ein *lacZ*-Gen, das eine multiple cloning side (MCS) enthält, in die die Insertionsstelle für das PCR Produkt integriert ist.

3.12.2 Transformation von *E. coli*

Anschließend wurde der Vektor in einen chemisch kompetenten *E. coli* Stamm transformiert. Der Ligationsansatz wurde auf Eis zu kompetenten *E. coli* Zellen pipettiert und 20 Minuten inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1,5 Minuten und einer einminütigen Inkubation auf Eis, wurden die transformierten *E.coli*-Zellen für die phänotypische Expression in 3 ml LB-Medium aufgenommen und unter Schütteln (200 rpm) 80 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Transformanten 5 Minuten bei 4000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in LB-Medium resuspendiert. Davon wurden jeweils 20 und 200 μl auf LB-Amp/X-Gal-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Dieser Stamm (INV α F') hat in seinem *lacZ*-Gen eine Mutation, so dass er nur eine enzymatisch inaktive β -Galaktosidase bilden kann. Nach einer Transformation des PCRII Vektors in *E. coli*-Zellen, können diese aber über α -Komplementation mit dem *lacZ*-Genprodukt des Vektors wieder eine funktionelle β -Galaktosidase bilden. Die Identifikation positiver Transformanten (mit rekombinantem Plasmid) erfolgt durch Blau-Weiß-Selektion auf LB-Platten, die Ampicillin und X-Gal enthalten. *E. coli* Zellen, die einen PCRII Vektor mit integriertem PCR-Produkt enthalten, verlieren die Fähigkeit zur α -Komplementation und damit zur Bildung einer aktiven β -Galaktosidase. Folglich kann das Substrat X-Gal nicht gespalten werden und die Kolonien bleiben weiß, während rekomplementierte Kolonien, mit einer funktionellen β -Galaktosidase, blau erscheinen.

3.12.3 ‚Screening‘ PCR zur Detektion des Inserts

Nach erfolgreicher Transformation wurden pro Platte einer *fla*-PCR-Probe, 4 Klone von weißen Kolonien in einer ‚Screening‘-PCR auf die erwartete Größe des Inserts untersucht. Hierfür wurden die Primer NEB 1233 und plaz-41 (Tab. 15) eingesetzt, die in der MCS des PCRII Vektors binden. Zunächst wurden in einem ersten Reaktionsansatz die entsprechenden Zellen in 5 µl 10 x-Puffer (15 mM MgCl₂) und 34,5 µl *Aqua dest.* eingemischt. Der Reaktionsansatz wurde zur Lysis der Bakterien 10 Minuten bei 99,9 °C im Thermocycler (Gene Amp PCR System 2700, Applied Biosystems, Weiterstadt) inkubiert. Nach einer Abkühlung auf 94 °C wurde ein zweiter Reaktionsansatz mit 8 µl dNTP's (40nM), je 1µl Primer NEB 1233 und plaz-41 und 0,5 µl AmpliTaq Gold Polymerase dazu pipettiert. Anschließend folgten 40 Zyklen mit einer Denaturierung von 1 Minute bei 94 °C, einer Primerhybridisierung von 1 Minute bei 50 °C und einer einminütigen Elongation bei 72 °C. Zuletzt erfolgte eine finale Elongationsphase von 7 Minuten bei 72 °C. Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 15: Sequenzen der verwendeten Primer.

NEB 1233	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
Plaz-41	5'-GCG ATT AAG TTG GGT AAC GCC AGG-3'
Sp6	5'-ATT TAG GTG ACA CTA TA-3'

3.12.4 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Um die klonierten Inserts in voller Länge sequenzieren zu können, wurde der PCRII Vektor mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche, Molecular Biochemicals Mannheim) aus den entsprechenden *E. coli* Klonen nach Anweisung des Herstellers isoliert. Zur Sequenzierung wurden 50 µl des isolierten Plasmids und der Primer Sp6 (Tab. 15) an die Firma Agowa Sequencing Services in Berlin geschickt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm DNAMAN (Lynnon Biosoft) analysiert.

3.13 Nachweis von *A. phagocytophilum*

3.13.1 Real-Time PCR zur Detektion des 16Sr-RNA-Gens

Mit dieser Methode sollte das 16Sr-RNA-Gen von *A. phagocytophilum* amplifiziert werden. Die verwendeten Primer und die Sonde wurden von einem Protokoll von Pusterla et al., 1999 übernommen, in dem eine Isolierung von *A. phagocytophilum* aus *I. ricinus* Zecken beschrieben wurde. Die Sequenzen der Primer Ep.145f und Ep.50r (Tab. 16) und die der TaqMan-Sonde Ep.80p (Tab. 16) weisen eine Kreuzreaktivität mit weiteren Rickettsien der *A. phagocytophilum*-Gruppe auf. Die Spezifität wurde von Pusterla et al. 1999 mit Erregern der *A. phagocytophilum*-Gruppe, *E. canis*, *N. risticii*, *A. marginale* und *Rickettsia rickettsii* überprüft.

In jedem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl (Tab. 17) wurden 20 µl Proben-DNA unter den in Tabelle 18 genannten Reaktionsbedingungen in einem iCycler (Biorad, München) amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde die aus der Extraktion zugehörige Negativkontrolle und als Positivkontrolle wurden *Ehrlichia*-Stämmen der *A. phagocytophilum*-Gruppe eingesetzt.

Tabelle 16: Primer-und Sondensequenzen der 16Sr-RNA-Real-Time PCR.

Ep.145f, forward primer	5'-CCA TTT CTA GTG GCT ATC CCA TAC TAC-3'
Ep.50r, reverse primer	5'-TCG AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TG-3'
Ep.80p, probe	5'-CCT ATG CAT TAC TCA CCC GTC TGC CAC T-3'
Modifizierung	5'-FAM, 3'-TAMRA

Tabelle 17: Reaktionsansatz der 16Sr-RNA-Real-Time PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	14,2 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5µl	
MgCl ₂	7µl	3,5 mM
Ep50r	0,4 µl	0,4 µM
Ep145f	0,4 µl	0,4 µM
Sep80p	2 µl	0,02 µM
dNTP's	0,5 µl	0,25 mM
HotStar <i>Taq</i> Polymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
DNA	20 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 18: Reaktionsbedingungen der 16Sr-RNA-Real-Time PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation	95°C	13 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	50x
Annealing	62°C	60 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

3.13.2 Real-Time PCR zur Detektion des *msp2*-Gens

Die 16Sr-RNA-Real-Time PCR ergab deutlich mehr positive Ergebnisse als erwartet (Kap. 4.4.1). Deshalb wurde zur Überprüfung der Spezifität eine weitere, kürzlich publizierte Real-Time PCR eingesetzt (Courtney et al., 2004), in der das *msp2*-Gen von *A. phagocytophilum* als Zielsequenz dient. Das *A. phagocytophilum msp2*-Gen kodiert für ein 44 KDa immundominantes Oberflächenprotein. Die ca. 80 Genkopien des *msp2*-Gens haben eine hochvariable zentrale Region, die von konservierten Sequenzabschnitten flankiert werden. Die Primer ApMSP2f und ApMSP2r (Tab. 19) und eine fluoreszenzmarkierte (Hex und FAM) TaqMan-Sonde ApMSP2p-Hex (Tab. 19) hybridisieren mit der konservierten Regionen des *msp2*-Gens. Die Sensitivität dieser PCR liegt bei der Amplifikation von einem Äquivalent 1/8 infizierter Zeckenzellen und ist

vergleichbar mit der Sensitivität von nested PCRs. Die hohe Spezifität für *A. phagocytophilum* erlaubt keine Amplifikation von *A. marginale* und vermutlich auch nicht von *A. ovis* oder *A. centrale*. Die Verwendung von aus Zecken extrahierter DNA hat nach Courtney et al. (2004) keinen nachteiligen Effekt auf Spezifität oder Sensitivität dieses Nachweisverfahrens.

Die Amplifikation von je 5 µl DNA pro untersuchte Probe erfolgte in 40 Zyklen in einem iCycler (Biorad, München). Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 20 bzw. Tabelle 21 aufgeführt. Negativ- und Positivkontrolle entsprechen denen der 16Sr-DNA-Real-Time PCR. Getestet wurden alle in der 16Sr-DNA-Real-Time PCR ermittelten positiven und grenzwertigen Proben.

Tabelle 19: Primer- und Sondensequenzen der *msp2*-Real-Time PCR.

ApMSP2f	5'-ATG GAA GGT AGT GTT GGT TAT GGT ATT-3'
ApMSP2r	5'-TTG GTC TTG AAG CGC TCG TA-3'
ApMSP2p-Hex	5'-TGG TGC CAG GGT TGA GCT TGA GAT TG-3'
Modifizierung	5'-Hex, 3'-TAMRA

Tabelle 20: Reaktionsansatz der *msp2*-Real-Time PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	11,375 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	2,5 µl	
MgCl ₂	4,5 µl	2,25 mM
ApMSP2f	0,225 µl	900 nM
ApMSP2r	0,225 µl	900 nM
ApMSP2p-Hex	0,0625 µl	125 nM
dNTP's	0,5 µl	0,1 mM
HotStar <i>Taq</i> Polymerase	0,25 µl	1,25U/Ansatz
DNA	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	25 µl	

Tabelle 21: Reaktionsbedingungen der *msp2*-Real-Time PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation	95 °C	10 min	1 x
Denaturierung	95 °	15 sec	40 x
Annealing-Elongation	60 °C	1 min	

3.13.3 Nested PCR zur Detektion des 16Sr-RNA-Gens

Als dritte PCR zur Bestätigung der positiven Proben wurde eine von Massung et al. (1998) beschriebene nested-PCR für das 16Sr-RNA-Gen eingesetzt. Die Sensitivität liegt bei 2 Kopien des 16Sr-RNA-Gens. Untersucht wurden alle *msp2*-positiven und zusätzlich 45 negative DNA-Proben, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Für die Primäramplifikation wurden die Primer ge3a und ge10r (Tab. 22) eingesetzt. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Gene Amp PCR-System 2700, Applied Biosystems, Weiterstadt) mit dem in Tabelle 23 bzw. Tabelle 24 beschriebenen Reaktionsansatz und -bedingungen. Für die nested PCR wurden 5 µl des DNA-Produkts der Primäramplifikation und die Primer ge9f und ge2 (Tab. 22) verwendet, und die Amplifikation in 30 Zyklen durchgeführt. Der Reaktionsansatz (Tab. 25) und die Reaktionsbedingungen (Tab. 26) entsprechen ansonsten denen der ersten Runde. In beiden PCRs wurde als Negativkontrolle *Aqua dest.* und als Positivkontrolle extrahierte DNA von *A. phagocytophilum*-Stämmen eingesetzt. Das Amplifikat wurde auf einem 2 %igen Agarosegel analysiert.

Tabelle 22: Sequenzen der verwendeten Primer für die 16Sr-RNA nested PCR.

Primäramplifikation:	
ge3a	5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG ATT ATT C-3'
ge10r	5'-TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT CTC C-3'
Nested PCR:	
ge9f	5'-AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T-3'
ge2	5'-GGC AGT ATT AAA AGC AGC TCC AGG-3'

Tabelle 23: Reaktionsansatz für die Primäramplifikation der 16Sr-RNA nested PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	29,5 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5 µl	75 nM
ge3a	1 µl	20 pM
ge10r	1 µl	20 pM
dNTP's	8 µl	40 nM
Ampli <i>Taq</i> GoldPolymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
DNA	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 24: Reaktionsbedingungen für die Primäramplifikation der 16Sr-RNA nested PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	40 x
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	
finale Elongation	72 °C	5 min	1 x

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die 16Sr-RNA nested PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	29,5 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5 µl	
ge9f	1 µl	20 pM
ge2	1 µl	20 pM
dNTP's	8 µl	40 nM
Ampli <i>Taq</i> GoldPolymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
Primärampifikat	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 26: Reaktionsbedingungen für die 16Sr-RNA nested PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1 x
Denaturierung	94 °C	30 sec	30 x
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	1 min	

3.14 Nachweis von *Babesia* spp.

Real-Time PCR zur Detektion von Piroplasmen

Zur Detektion von Piroplasmen wurde eine Real-Time PCR zur Detektion des ribosomalen 18S-Gens von Piroplasmen und Hepatozoon nach Zahler-Rinder M. (unveröffentlicht) angewandt. Die Primer (Tab. 27) PIR2 und PIR3 wurden aus dem 3'-Ende des 18SrRNA-Gens gewählt, so dass eine Babesien-, Theilerien- und Hepatozoon-DNA nachgewiesen werden können. Die Sonde (Tab. 27) PIR-S-1 detektiert ein 102 Basenpaare großes PCR-Produkt.

Die PCR wurde in einem iCycler (Biorad, München) durchgeführt, wobei pro Reaktionsansatz (Tab. 28) 20 µl DNA unter den in Tabelle 29 aufgeführten Bedingungen amplifiziert wurde. Als Negativkontrollen wurde die den untersuchten Proben zugehörige

Negativkontrolle der DNA-Extraktion sowie aus *B. divergens*-Stämmen extrahierte DNA als Positivkontrolle mitgeführt.

Tabelle 27: Sequenzen von Primern und der Sonde der Piroplasmen Real-Time PCR.

PIR2, reverse primer	5'-CGA ATA ATT CAC CGG ATC AC-3'
PIR3, forward primer	5'-AAT CAT GAA CGA GGA ATG C-3'
PIR-S-1, probe	5'-CGC GAT ACA CAC CGC CCG TCG CTT CGC G-3'
Modifizierung	5': 6-FAM, 3': Dabcyl

Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Piroplasmen-Real-Time PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	8,4 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5µl	
MgCl ₂	13µl	6,5 mM
PIR2	1 µl	1 µM
PIR3	1 µl	1 µM
PIR-S-1	0,1 µl	0,1 µM
dNTP's	1 µl	0,5 mM
HotStar <i>Taq</i> Polymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
DNA	20 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 29: Reaktionsbedingungen für die Piroplasmen-Real-Time PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Inkubation	95°C	13 min	1x
Denaturierung	95°C	30 sec	50x
Annealing	50°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	

3.15 Überprüfung einer Inhibition

Zur Überprüfung einer Inhibition der PCRs durch z.B. Blutkomponenten in gesaugten Zecken wurde 4 µl DNA von 10 positiven und 25 negativen Proben mit je 1 µl β-Aktin aus HL60 Zellen vermischt und in einer PCR mit β-Aktin Primern (Tab. 30) nach dem Protokoll von Murray et al. (1990) in einem Thermocycler (Gene Amp PCR-System 2700, Applied Biosystems, Weiterstadt) getestet. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 31 und Tabelle 32 aufgeführt. Das Amplifikat wurde auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Tabelle 30: Sequenzen der Primer.

β-Aktin forward Primer	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
β-Aktin reverse Primer	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'

Tabelle 31: Reaktionsansatz β-Aktin PCR.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
<i>Aqua dest.</i>	29,5 µl	variabel
PCR 10 x Puffer	5µl	
β –Actin forward Primer	1 µl	20 pM
β –Actin reverse Primer	1 µl	20 pM
dNTP's	8 µl	40 nM
Ampli <i>Taq</i> GoldPolymerase	0,5 µl	2,5U/Ansatz
DNA	5 µl	variabel
Gesamtvolumen	50 µl	

Tabelle 32: Reaktionsbedingungen β -Aktin PCR.

Reaktion	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	92°C	3 min	1x
Denaturierung	94°C	45 sec	50x
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	

3.16 Differenzierung der *B. burgdorferi* sensu lato- und *A. phagocytophilum*-Stämme durch Sequenzierung der *ospA*-Gen- bzw. der 16Sr-RNA-Gen-Amplifikate

Für die Sequenzierung des *ospA*-Gen-Amplifikats von *B. burgdorferi* sensu lato und des 16Sr-RNA-Gen-Amplifikats von *A. phagocytophilum* wurden 50 μ l des jeweiligen PCR-Produkts mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt und in 50 μ l Elutionspuffer eluiert. Ein Aliquot des Eluats wurde auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt, um die in der Probe enthaltene DNA-Menge abzuschätzen. Dies geschah durch den Vergleich der in der Gelelektrophorese sichtbaren Banden mit dem definierten DNA-Längenstandard VIII (Boehringer, Mannheim GmbH). Anschließend wurden etwa 1-3 μ l (20 ng) des aufgereinigten PCR-Amplifikats, je 1 μ l (5 pmol) Primer V3a und R2 (Kap. 3.11.2) bzw. ge2 und ge9f (Kap. 3.13.3) und 4 μ l Big Dye ABI PRISM (enthält Dye Terminatoren, dNTP's, AmpliTaq DNA Polymerase, MgCl₂, Puffer) mit *Aqua dest.* auf 20 μ l aufgefüllt.

Die DNA wurde in 25 sich wiederholenden Zyklen von je 10 Sekunden bei 96 °C, 5 Sekunden bei 45 °C und 4 Minuten bei 60 °C in einem Thermocycler (Gene Amp PCR-System 2700, Applied Biosystems, Weiterstadt) amplifiziert. Darauf wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz von 20 μ l mit 50 μ l 100%igem Ethanol und 2 μ l 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) versetzt und gemischt. Nach

einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet im Thermoblock bei 50 °C getrocknet.

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma Agowa Sequencing Services in Berlin.

3.17 Sequenzanalysen

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm DNAMAN (Lynnon Biosoft) bearbeitet und mit der Blast-Suche in der Gendatenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov / BLAST /](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) nach homologen Sequenzen gesucht.

3.18 Statistik

Konfidenzintervalle, d.h. die Intervalle, in denen sich der wahre Wert der Prävalenz um den zuvor errechneten Prozentwert bewegt, wurden mit Hilfe von Microsoft Excel® unter Zugrundelegung der Binomialverteilung bei einem Vertrauensbereich von 95% errechnet. Konfidenzintervalle wurden bei grafischen Darstellungen um den Prävalenzwert jeweils mit helleren Farbtönen dargestellt. Zum Vergleich von Prävalenzen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet und der Wert der Wahrscheinlichkeit (p), dass zwei Gruppen identisch sind, über Microsoft Excel® berechnet. Der erhaltene Wert wurde folgendermaßen interpretiert: ein Wert von 5% oder mehr zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Klassen existiert, ein Wert kleiner als 5% bezeichnet einen signifikanten Unterschied. Liegt der Wert unter 1% wird dies als hochsignifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Prävalenz von *B. burgdorferi sensu lato* in *I. ricinus*

In der vorliegenden Studie wurden 625 aus drei Sammelgebieten (Englischer Garten/München; Isar Auen/München; Vilshofen/Passau) in Süd-Bayern stammende, adulte nüchterne und 275 adulte gesaugte *I. ricinus* Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg und 25 adulte gesaugte *I. ricinus* Zecken von Weiderindern aus einem Endemiegebiet für bovine granulozytäre Ehrlichiose in der Schweiz auf eine Infektion mit *B. burgdorferi sensu lato* untersucht. Zusätzlich wurden die *B. burgdorferi sensu lato* zugehörigen Subspezies und OspA-Typen bestimmt.

4.1.1 Bestimmung der Infektionsrate durch PCR-Amplifikation des *fla*-Gens

Alle 925 Zecken wurden zuerst mit einer das *fla*-Gen detektierenden Real-Time PCR auf eine Infektion mit *B. burgdorferi sensu lato* untersucht. Eine Probe wurde dann als positiv gewertet, wenn in der Real-Time PCR die Fluoreszenz einen Schwellenwert, den sogenannten „Threshold“, überschritt und einen sigmoiden Kurvenverlauf zeigte, entsprechend einer exponentiellen Zunahme des PCR-Produkts (Abb.5). Proben, die erst ab dem 42. Amplifikationszyklus einen schwachen Anstieg zeigten, wurden als negativ beurteilt.

Amplifikationszyklus

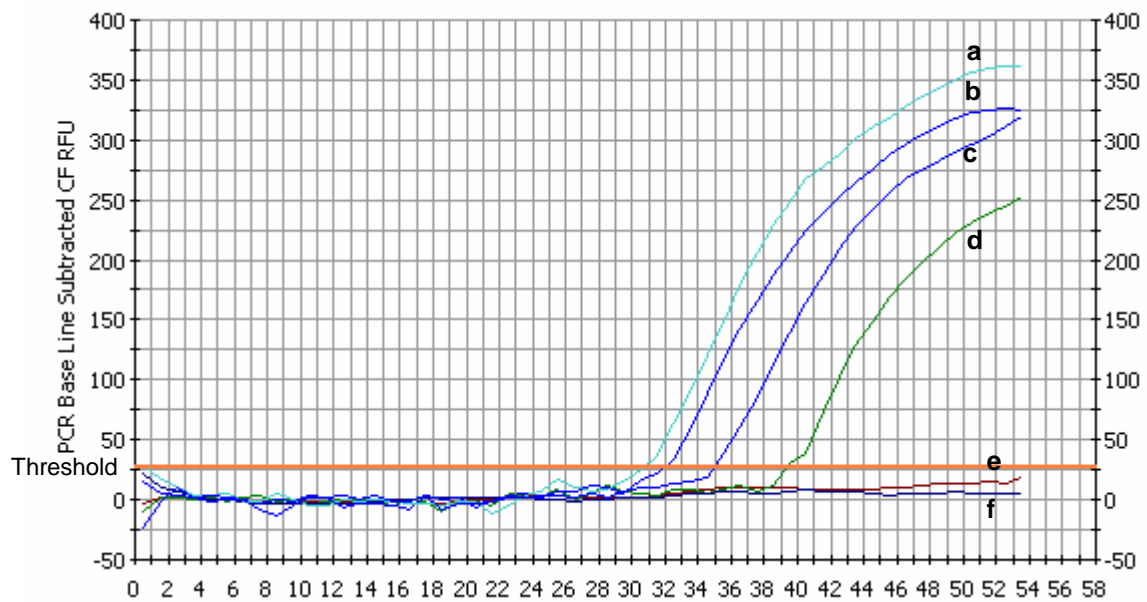


Abbildung 5: *fla*-Real-Time PCR: Darstellung der Amplifikation in Form von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU), wobei a) den Kurvenverlauf der Positivkontrolle darstellt, b), c) und d) stellen *fla*-positive Proben von Zecke Nr. 56, 57 und 58 aus Passau dar. e) und f) zeigen den Kurvenverlauf einer *fla*-negativen Probe von Zecke Nr. 59 aus Passau bzw. den der Negativkontrolle.

Insgesamt wurden 38,9% (243 von 626) der untersuchten DNA-Proben von nüchternen und 9,7% (29 von 300) DNA-Proben von gesaugten Zecken als positiv für *B. burgdorferi sensu lato* gewertet. Dabei konnte in 9,1% der gesaugten Zecken von Hunden und 16,0% der gesaugten Zecken von Rindern eine Infektion nachgewiesen werden. Alle Ergebnisse in Bezug auf Herkunft, Geschlecht, Blutaufnahme-Status und Infektion sind in den Tabellen 33 und 34 dargestellt.

Zwischen den Prävalenzen von *B. burgdorferi sensu lato* positiven *I. ricinus* bei nüchternen bzw. gesaugten Zecken besteht ein hochsignifikanter Unterschied (Chi²-Test: p = 0,0%) (Abb. 7).

4.1.2 Bestimmung der Infektionsrate durch PCR-Amplifikation des *ospA*-Gens

Alle in der *fla*-Real-Time PCR ermittelten positiven Proben wurden durch Amplifikation eines zweiten Gens – semi-nested PCR des *ospA*-Gens – verifiziert.

Um falsch negative Proben bei der *fla*-PCR auszuschließen, wurden zusätzlich 90 negative Proben mit der *ospA*-PCR untersucht (Kap. 3.11.2). Diese PCR wurde wegen der

nachfolgenden, auf dem *ospA*-Gen basierenden, RFLP-Analyse als Referenzmethode für die Auswertung festgelegt. Als positives Ergebnis wurde eine einzelne DNA-Bande von etwa 800 Bp gewertet (Abb. 6). Eine gewisse Heterogenität in der Größe des Amplifikats beruht auf den verschiedenen *Borrelia*-Stämmen. Da die geringen Längendifferenzen in der Praxis aber nicht zu unterscheiden sind wurde zur Vereinfachung das positive PCR-Produkt, unabhängig von der Borrelienspezies, als 800 Bp Bande definiert .

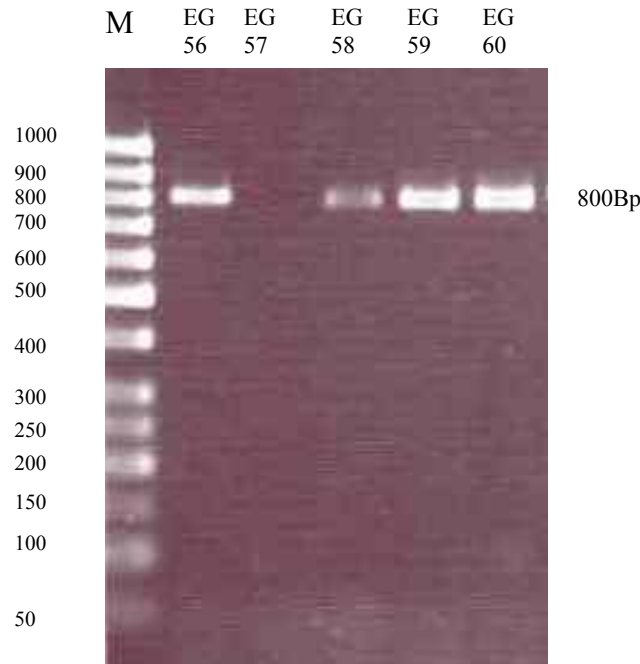


Abbildung 6: Nachweis von *B. burgdorferi sensu lato* in Zecken durch PCR-Amplifikation eines 800 bp *ospA*-Genabschnitts. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2% igen Agarosegel aufgetrennt. Als Beispiel ist das Ergebnis von 5 Zecken aus dem Englischen Garten dargestellt. M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII). Die Probe EG 57 zeigt eine nicht infizierte Zecke.

Von den 243 nüchternen und 29 gesaugten positiven Zecken in der *fla*-PCR waren 221 (91%) bzw. 25 (86,2%) in der *ospA*-PCR positiv, bzw. 26 von insgesamt 272 (9,6%) *fla*-PCR positiver Proben konnten in der *ospA*-PCR nicht bestätigt werden. Von den ebenfalls 90 getesteten negativen Zecken ergab eine Zecke in der *ospA*-PCR ein positives Ergebnis.

Davon ausgehend, dass die *ospA*-PCR als Referenzmethode diene, ergab diese PCR bei nüchternen Zecken eine *B. burgdorferi sensu lato*-Prävalenz von 35,4% (31,7% bis 39,2%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung).

Dabei wurde für das Gebiet im Englischen Garten eine Durchseuchungsrate von 37,2% (30,9% bis 44%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung), für das Gebiet in den Isar Auen 35,8% (29,5% bis 42,5%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) und für das Gebiet bei Passau eine Durchseuchungsrate von 33,2% (27% bis 39,8%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) ermittelt (Tab. 33). Beim Vergleich dieser Prävalenzen der einzelnen Sammelgebiete mit jeweils beiden anderen Regionen konnte kein signifikanter Unterschied errechnet werden (Chi²-Test: p Englischer Garten = 55,7%, p Isar Auen = 95,7%, p Passau = 46,7%).

Der Unterschied zwischen der Prävalenz bei allen untersuchten männlichen und weiblichen (nüchternen und gesaugten) Zecken ist hochsignifikant (Chi²-Test: p = 0,0%). In Bezug auf die Sammelgebiete konnte bei einem Vergleich der Durchseuchungsraten der nüchternen Zecken kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen *I. ricinus* der unterschiedlichen Regionen ermittelt werden (Chi²-Test: p = 19,5%).

Tabelle 33: Ergebnisse der *fla*-Real-Time PCR und *ospA*-PCR in Bezug auf Herkunft, Geschlecht, Blutaufnahme-Status und Infektion von nüchternen Zecken

	insgesamt		95% Konfidenzintervall	weiblich		95% Konfidenzintervall	männlich		95% Konfidenzintervall
	n	%		n	%		n	%	
Englischer Garten									
Anzahl									
Zecken	207	100	-	88	42,5	-	119	57,5	-
<i>fla</i> -positiv	87	42,1	35,3-48,8	38	43,2	33,0-53,4	48	40,3	31,9-49,6
<i>ospA</i> -positiv	77	37,2	30,9-44,0	31	35,2	25,0-45,5	46	38,7	30,3-47,1
Isar Auen									
Anzahl									
Zecken	207	100	-	90	43,5	-	117	56,5	-
<i>fla</i> -positiv	78	37,7	30,9-44,4	29	32,2	23,3-42,2	49	41,9	33,3-51,3
<i>ospA</i> -positiv	74	35,8	29,5-42,5	26	28,9	20,0-38,9	48	41,0	32,5-49,6
Passau									
Anzahl									
Zecken	211	100	-	162	76,8	-	49	23,2	-
<i>fla</i> -positiv	78	37	30,3-43,6	59	36,4	29,0-43,8	19	38,8	24,5-53,1
<i>ospA</i> -positiv	70	33,2	27,0-39,8	55	34,0	26,5-41,4	15	30,6	18,4-42,9

Die Durchseuchungsraten der gesaugten Zecken von Hunden und Rindern lagen bei 8,4% (5,1% bis 11,6%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) bzw. 8,0% (0,0% bis 20,0%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) (Tab. 34). Auf Grund der geringen Probenzahl der gesaugten Zecken von Rindern, bzw. dem geringen Unterschied der Prävalenzen von gesaugten Zecken von Hunden und Rindern (0,4%), wurde auf eine Auswertung mittels Chi²-Test verzichtet.

Zwischen den Prävalenzen bei nüchternen und gesaugten Zecken besteht ein hochsignifikanter Unterschied (Chi²-Test: $p = 0,0\%$) (Abb. 7).

Tabelle 34: Ergebnisse der *fla*-Real-Time PCR und *ospA*-PCR in Bezug auf Herkunft, Geschlecht, Blutaufnahme-Status und Infektion von gesaugten Zecken

	Hund		95%	Rind		95%
	n	%	Konfidenzintervall	n	%	Konfidenzintervall
Anzahl Zecken	275	91,7	-	25	8,33	-
<i>fla</i> -positiv	25	9,1	5,8-12,7	4	16,0	4,0-32,0
<i>ospA</i> -positiv	23	8,4	5,1-11,6	2	8,0	0,0-20,0

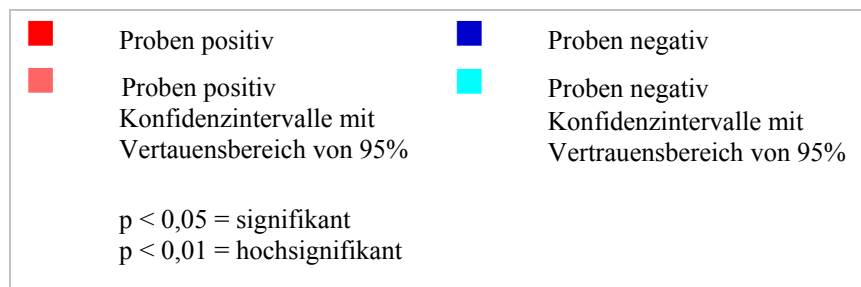
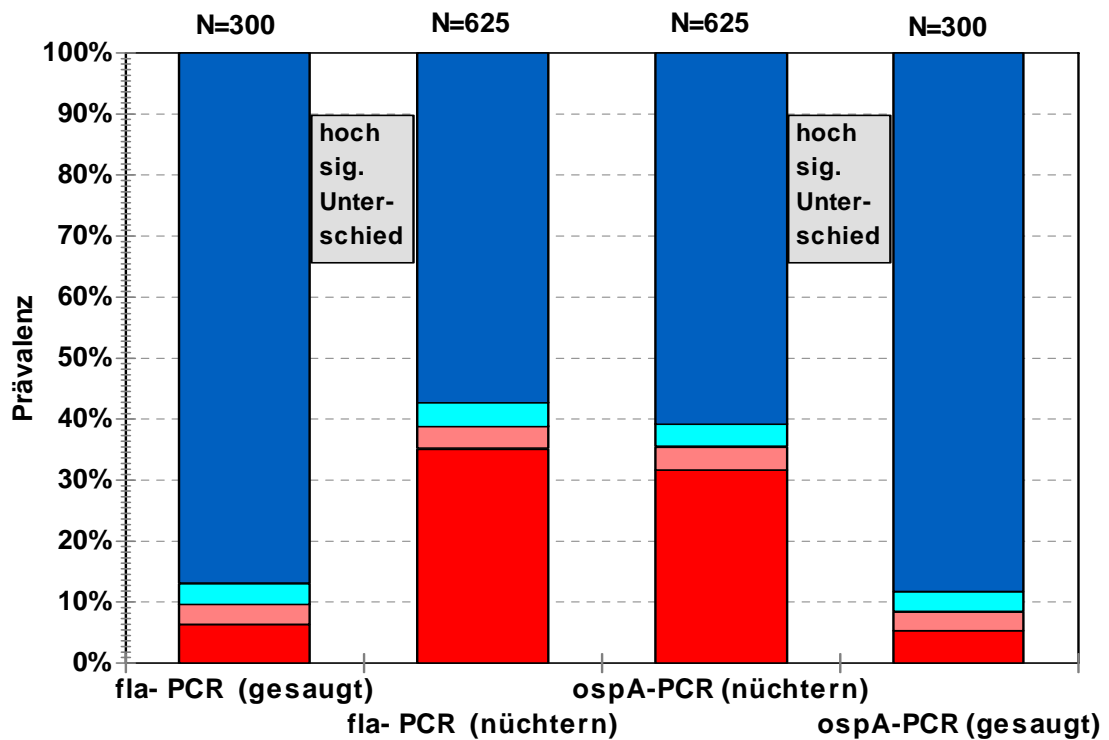


Abbildung 7: Sowohl bei der *fla*-PCR als auch bei der *ospA*-PCR besteht zwischen den Prävalenzen bei nüchternen bzw. gesaugten Zecken ein hochsignifikanter Unterschied (Chi²-Test: $p = 0,0\%$). Da es sich hier um zwei unterschiedliche Nachweisverfahren handelt, wurde kein statistischer Vergleich zwischen den Prävalenzen der zwei Methoden durchgeführt.

4.2 Typisierung der *Borrelia*-Stämme durch RFLP-Analyse des *ospA*-Gen Amplifikats

Alle Amplifikate der *ospA*-PCR wurden zur Bestimmung der einzelnen *B. burgdorferi* sensu lato Spezies und der dazugehörigen *OspA*-Typen mittels RFLP analysiert (Kap. 3.11.3). Die Produkte der *ospA*-PCR wurden mit den Restriktionsenzymen *SspI*, *SfuI*, *BglIII*, *HindIII* und *Kpn21* verdaut. Da diese Enzyme individuelle Schnittstellen im *ospA*-Gen haben, entsteht für die Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* ein jeweils charakteristisches RFLP-Muster, während die Spezies *B. garinii* entsprechend der Heterogenität im *ospA*-Gen, ein heterogenes Schnittmuster zeigt (Michel et al., 2003). Dabei gibt es für jeden der bisher beschriebenen, mit *B. garinii* assoziierten, 6 *OspA*-Typen (Wilske et al., 1993,1996a) ein eigenes RFLP-Muster. Bei A14S und dem *B. valaisiana* Stamm M53 sind die Schnittstellen mit den hier verwendeten Enzymen gleich, so dass anhand der RFLP-Analyse zunächst keine Differenzierung dieser Spezies voneinander möglich ist, sondern eine Sequenzanalyse der entsprechenden Amplifikate zur Spezifizierung notwendig war.

Bei Mehrfachinfektionen entspricht das resultierende RFLP-Muster einer Mischung der charakteristischen Einzelbilder (Kap. 4.2.5).

Die nach Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus resultierenden ‚Bandenmuster‘ (Variation in Fragmentgröße und –anzahl) sind in Abbildung 8 und Abbildung 9 zu sehen. Die exakten Bandenlängen der einzelnen Typen weichen nur geringfügig von 800 Bp ab (Kap. 4.1.2). Zur Vereinheitlichung der Darstellung wird hier das *ospA*-Amplifikat der verschiedenen Subtypen als 800 Bp Fragment bezeichnet.

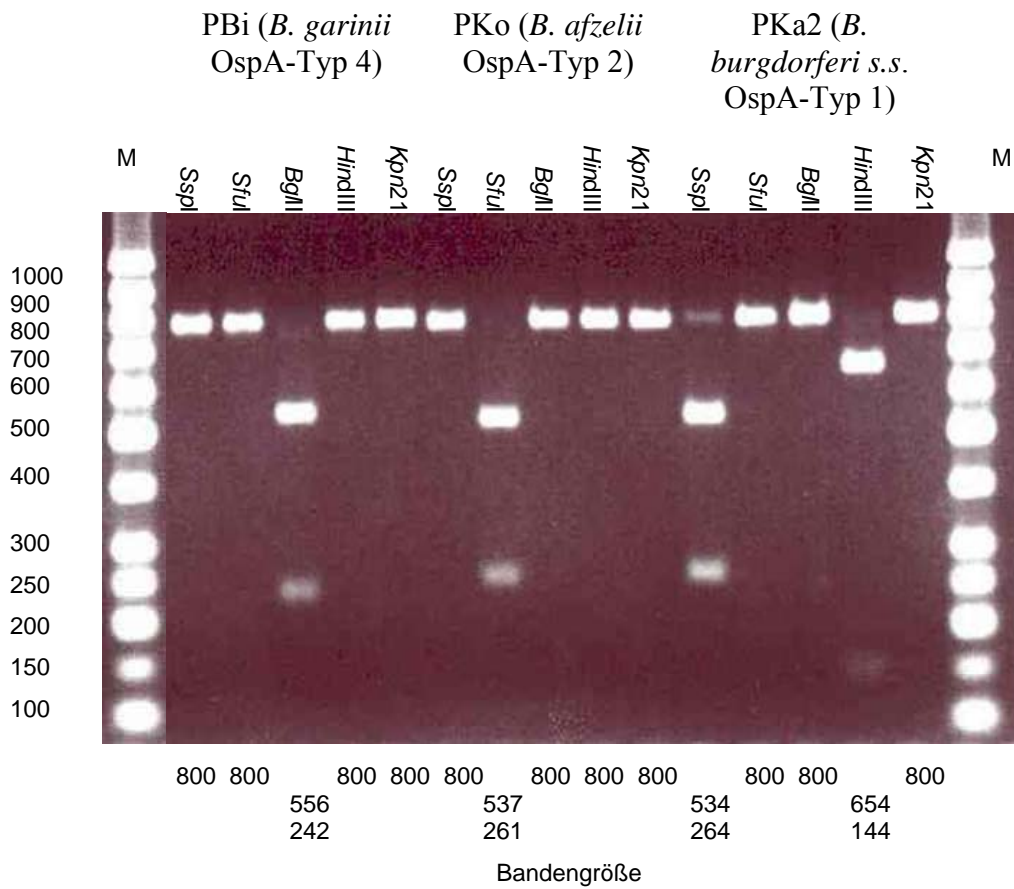
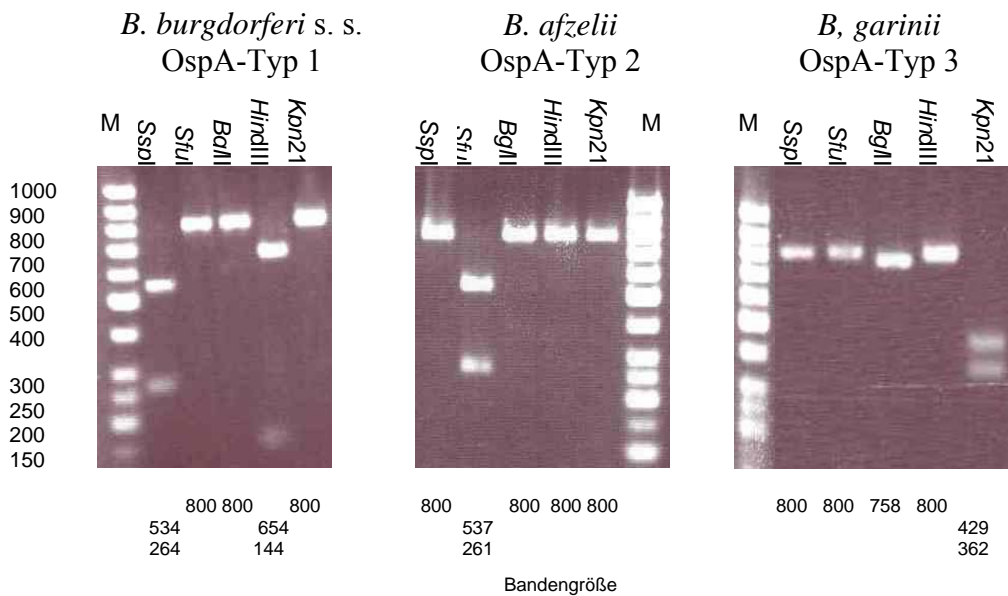


Abbildung 8: RFLP-Analyse der als Positivkontrolle eingesetzten Stämme PBi (*B. garinii*), PKo (*B. afzelii*) und Pka2 (*B. burgdorferi* sensu stricto). M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).



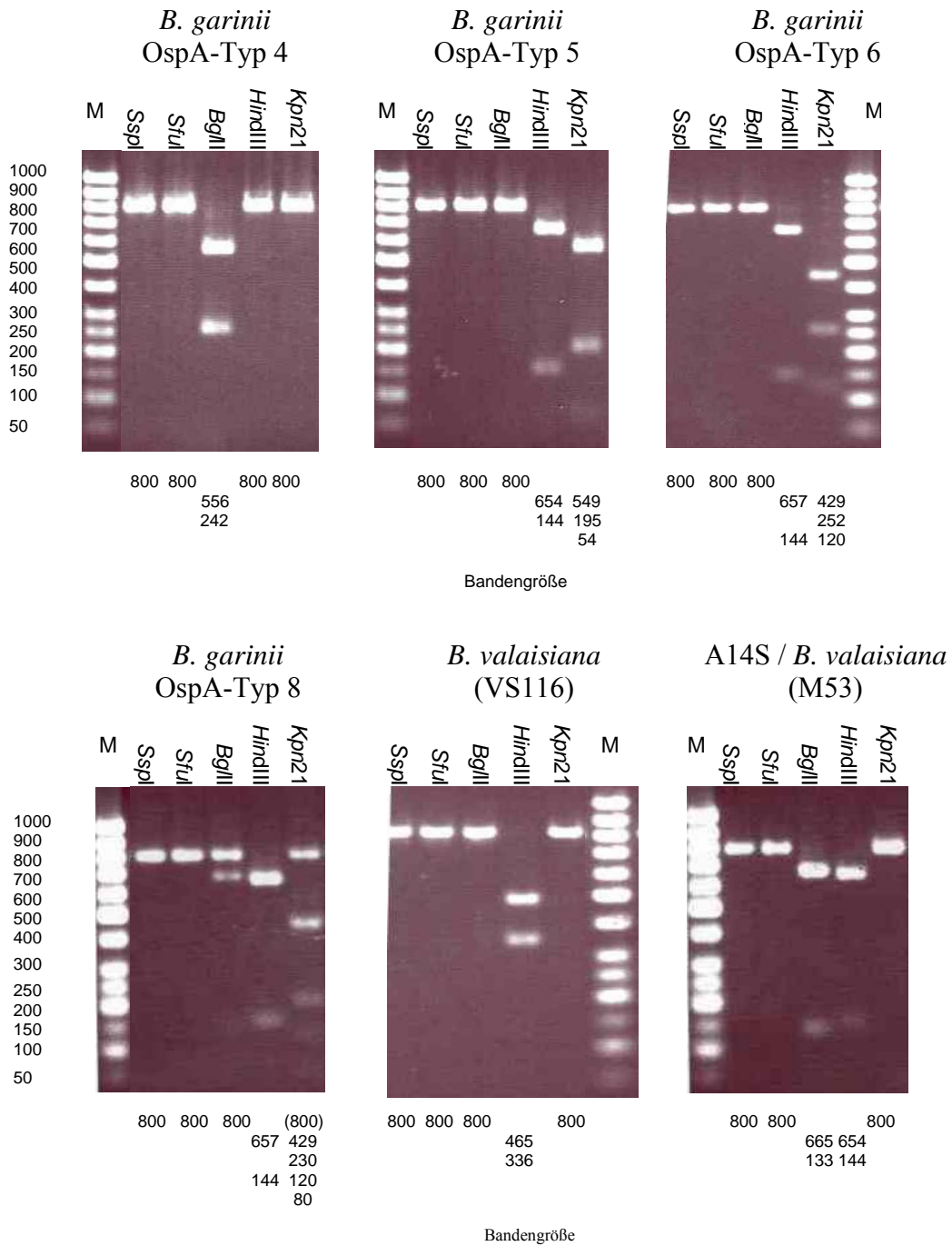


Abbildung 9: RFLP-Muster der in *I. ricinus* gefundenen *B. burgdorferi* sensu lato Spezies und OspA-Typen. M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

4.2.1 Ergebnisse der OspA-Typisierung

Bei nüchternen *I. ricinus* Zecken wurde *B. afzelii* mit einer relativen Häufigkeit von 27,2% nachgewiesen, gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto mit 24,9%, *B. garinii* mit 22,2%,

B. valaisiana mit 19,9% und A14S mit 9,5% (Tab. 35). A14S kam dabei hochsignifikant seltener als alle anderen Spezies vor (Chi²-Test: p *B. burgdorferi* sensu stricto = 0,0%; p *B. afzelii* = 0,0%; p *B. garinii* = 0,0%; p *B. valaisiana* = 0,1%).

Dagegen wurden bei den gesaugten Zecken relative Häufigkeiten von 40,0% für *B. garinii*, von 24,0% für *B. valaisiana*, 20,0% für *B. burgdorferi* sensu stricto, 16,0 % für *B. afzelii* und 4,0% für A14S errechnet (Tab. 36).

B. lusitaniae war bei nüchternen und gesaugten Zecken nicht detektierbar. Die Prävalenzen der gefundenen Spezies und *OspA*-Typen von *B. burgdorferi* sensu lato bei nüchternen und gesaugten Zecken sind nochmals in den Abbildungen 10 bzw. 11 dargestellt.

4.2.2 Ergebnis der Sequenzierung

Da nach Restriktionsspaltung das ‚Bandenmuster‘ des *B. valaisiana* Stamms M53 und der *Borrelia* Spezies A14S mit den hier verwendeten Enzymen identisch ist (Abb. 9), und somit zunächst keine Differenzierung zwischen diesen Spezies möglich war, wurden die entsprechenden *ospA*-Amplifikate nach einer Sequenzierung zugeordnet. Die ermittelten Prävalenzen von A14S (accession No. AF102057) und *B. valaisiana* (Stamm M53; accession No. AF095947) für nüchterne und gesaugte Zecken sind in Abbildungen 10 bzw. 11 dargestellt. Das ‚Bandenmuster‘ einer weiteren Probe konnte ebenfalls nicht eindeutig zugeordnet werden. Nach der Sequenzierung wurde diese Probe als *OspA*-Typ 8 (Abb. 9) identifiziert (accession No. BBY10896).

Tabelle 35: Prävalenz der OspA-Typen in nüchternen Zecken, bezogen auf 221 *ospA*-PCR positive Proben.

OspA-Typ	Gesamtzahl nüchterne Zecken	Positive nüchterne Zecken		unterer Wert	oberer Wert	95% Konfidenzintervall
		n	%			
<i>B. burgdorferi</i> .s.s. / OspA-Typ 1	221	55	24,9	43	68	19,5-30,8
<i>B. afzelii</i> / OspA-Typ 2	221	60	27,2	47	73	21,3-33,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 3-8	221	49	22,2	37	61	16,7-27,6
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 3	221	18	8,1	10	26	4,5-11,7
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 4	221	2	0,9	0	5	0,0-2,3
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 5	221	7	3,2	2	12	0,9-5,4
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 6	221	21	9,5	13	30	5,9-13,6
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 7	221	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 8	221	1	0,5	0	3	0,0-1,4
<i>B. valaisiana</i>	221	44	19,9	33	56	14,9-25,3
A14S	221	21	9,5	13	30	5,9-13,6

Tabelle 36: Prävalenz der OspA-Typen in gesaugten Zecken, bezogen auf 25 *ospA*-PCR positive Proben.

OspA-Typ	Gesamtzahl gesaugte Zecken	Positive gesaugte Zecken		unterer Wert	oberer Wert	95% Konfidenzintervall
		n	%			
<i>B. burgdorferi</i> .s.s. / OspA-Typ 1	25	5	20,0	1	9	4,0-36,0
<i>B. afzelii</i> / OspA-Typ 2	25	4	16,0	1	8	4,0-32,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 3-8	25	10	40,0	5	15	20,0-60,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 3	25	5	20,0	1	9	4,0-36,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 4	25	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 5	25	3	12,0	0	6	0,0-24,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 6	25	2	8,0	0	5	0,0-20,0
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 7	25	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i> / OspA-Typ 8	25	-	-	-	-	-
<i>B. valaisiana</i>	25	6	24,0	2	10	8,0-40,0
A14S	25	1	4,0	0	3	0,0-12,0

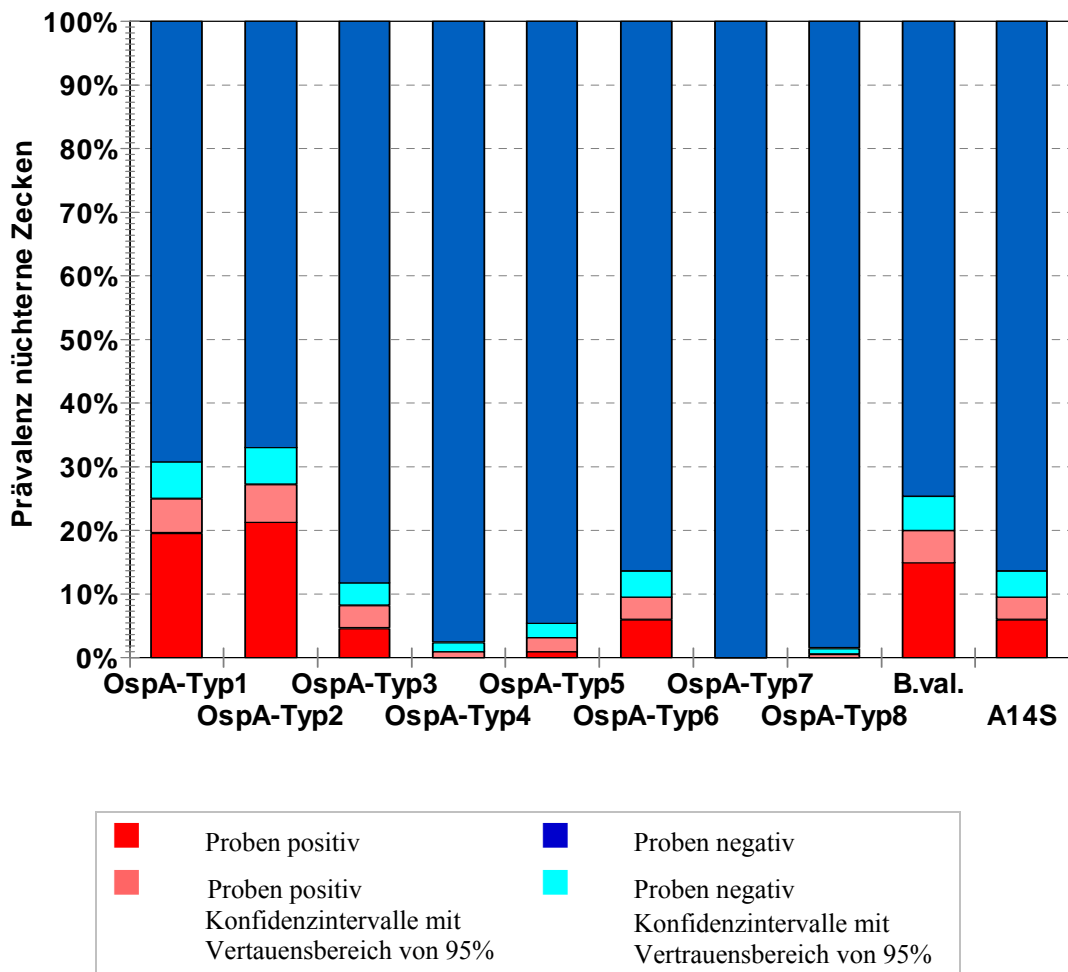


Abbildung 10: Prävalenzen der OspA-Typen 1-8 bzw. von *B. valaisiana* und A14S in nüchternen Zecken aus insgesamt drei Sammelgebieten in Bayern. Die Mischinfektionen (Kap. 4.2.5) sind in den Prävalenzen integriert.

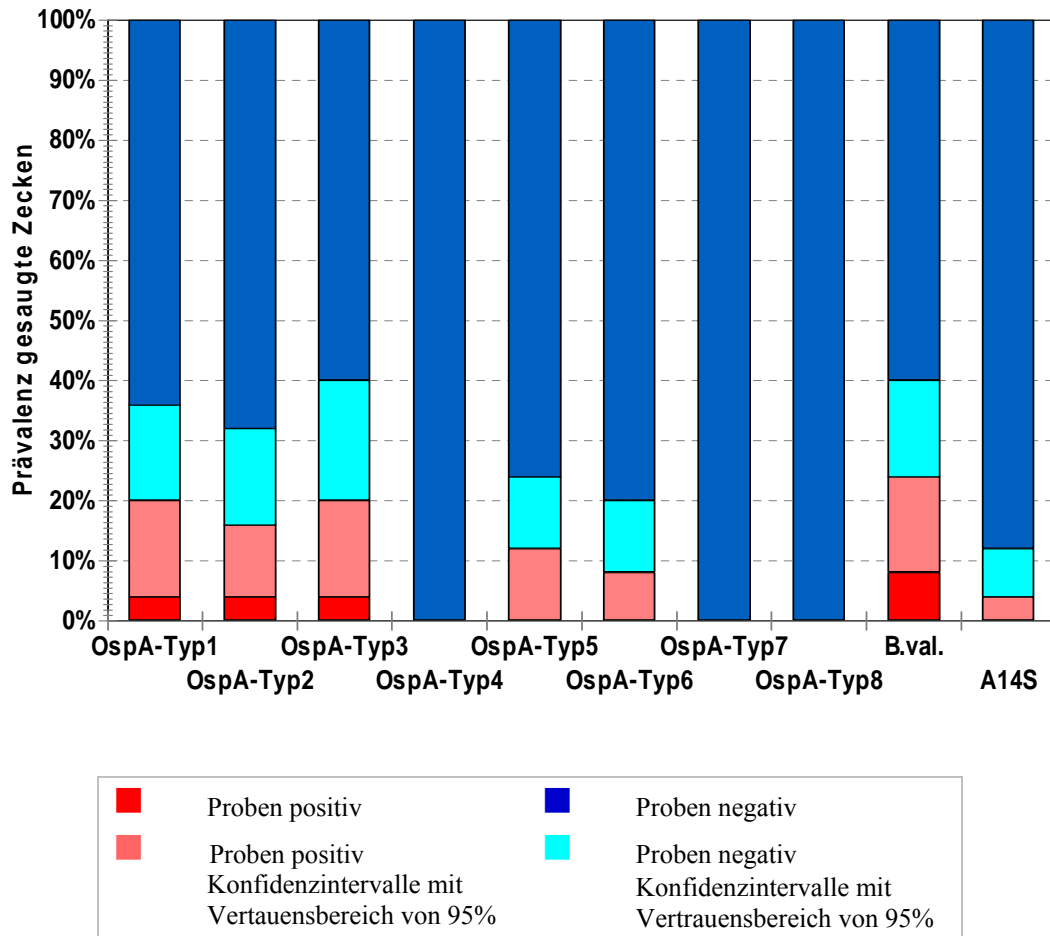


Abbildung 11: Prävalenzen der OspA-Typen 1-8 bzw. von *B. valaisiana* und A14S in gesaugten Zecken (von Hunden und Rindern). Die Mischinfektionen (Kap. 4.2.5) sind in den Prävalenzen integriert.

4.2.3 Lokale Variation der gefundenen Borrelien-Spezies

Insgesamt zeigte sich in jedem Sammelgebiet ein sehr heterogenes Muster für die einzelnen *Borrelia*-Spezies und deren OspA-Typen. Die relativen Häufigkeiten der gefundenen Spezies in den einzelnen Sammelgebieten sind in Tabelle 37 aufgeführt.

Die relative Häufigkeit von *B. afzelii* lag zwischen 20,0% und 39,0%, wobei im Englischen Garten *B. afzelii* mit 39,0% die am häufigsten detektierte Spezies war. In den Isar Auen konnte dagegen am häufigsten *B. garinii* in 33,8% der untersuchten Zecken dieses Gebietes nachgewiesen werden. In Passau lag die relative Häufigkeit von *B. garinii* bei 21,4% und im Englischen Garten bei 11,7%.

B. burgdorferi sensu stricto war in den Isar Auen und in Passau mit einer relativen Häufigkeit von 31,0% bzw. 30,0% die jeweils am häufigsten gefundene Spezies. Die relativen Häufigkeiten von *B. valaisiana* variierten von 16,2% bis 27,1%.

A14S wurde in 18,2% der untersuchten Zecken aus dem Englischen Garten nachgewiesen, während die relative Häufigkeit dieser Spezies in den Isar Auen bei 5,4% und in Passau bei 4,3% lag.

4.2.4 OspA-Subtypisierung von *B. garinii*

Die OspA-Typisierung der Borrelien mittels RFLP-Analyse ermöglichte außer der Speziesdifferenzierung, auch eine Analyse der Verteilung der verschiedenen OspA-Typen 3-8 von *B. garinii*. Die Verteilung der OspA-Typen in den einzelnen Sammelgebieten und in gesaugten Zecken ist in Tabelle 37 bzw. 38 aufgeführt.

In den mit *B. garinii* infizierten nüchternen Zecken konnte der OspA-Typ 6 mit 9,5% (21 von 221) am häufigsten nachgewiesen werden, gefolgt von OspA-Typ 3 mit 8,1% (18 von 221). Seltener waren der OspA-Typ 5 mit 3,2% (7 von 221), OspA-Typ 4 mit 0,9% (2 von 221) und OspA-Typ 8 mit 0,5% (1 von 221). OspA-Typ 7 konnte in keinem Gebiet nachgewiesen werden.

Die OspA-Typen 3, 5 und 6 konnten in allen drei Sammelgebiete nachgewiesen werden, während der OspA-Typ 4 nur zweimal und der OspA-Typ 8 nur einmal im Gebiet Isar Auen gefunden wurde.

Die relative Häufigkeit von *B. garinii* infizierten gesaugten Zecken lag für den OspA-Typ 3 bei 20,0% (5 von 25), gefolgt von OspA-Typ 5 mit 12,0% (3 von 25) und OspA-Typ 6 mit 8,0% (2 von 25). Die OspA-Typen 4, 7 und 8 konnten bei keiner der gesaugten Zecken detektiert werden.

Tabelle 37: Relative Häufigkeiten der gefundenen Borrelien-Spezies und OspA-Typen in infizierten *I. ricinus* aus den drei Sammelgebieten Englischer Garten, Isar Auen und Passau. Die Mischinfektionen in den Gebieten Englischer Garten (OspA-Typ 2 und A14S), Isar Auen (OspA-Typ 1 + 2; *B. valaisiana* + OspA-Typ 6; OspA-Typ 2 + 4 + A14S) und Passau (2 x *B. valaisiana* + A14S) sind in den Häufigkeitsangaben integriert.

Spezies	OspA-Typ	Englischer Garten		Isar Auen		Passau	
		Anzahl der positiven Zecken	Relative Häufigkeit	Anzahl der positiven Zecken	Relative Häufigkeit	Anzahl der positiven Zecken	Relative Häufigkeit
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	12	15,6%	23	31,1%	21	30%
<i>B. afzelii</i>	2	30	39%	16	21,6%	14	20%
<i>B. garinii</i>	3	5	6,5%	5	6,8%	8	11,4%
<i>B. garinii</i>	4	0	0%	2	2,7%	0	0%
<i>B. garinii</i>	5	1	1,3%	4	5,4%	2	2,9%
<i>B. garinii</i>	6	3	3,9%	13	17,6%	5	7,1%
<i>B. garinii</i>	7	-	-	-	-	-	-
<i>B. garinii</i>	8	0	0%	1	1,4%	0	0%
<i>B. valaisiana</i>		13	16,9%	12	16,2%	19	27,1%
A14S		14	18,2%	4	5,4%	3	4,3%

Tabelle 38: Relative Häufigkeiten der gefundenen Borrelien-Spezies und OspA-Typen in gesaugten *I. ricinus* von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg und Rindern aus der Schweiz. Die Mischinfektion von *B. valaisiana* und A14S in einer gesaugten Zecke vom Hund ist in den Häufigkeitsangaben integriert.

Spezies	OspA-Typ	Hund		Rind	
		Anzahl der positiven Zecken	Relative Häufigkeit	Anzahl der positiven Zecken	Relative Häufigkeit
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	4	16,0%	1	4,0%
<i>B. afzelii</i>	2	3	12,0%	1	4,0%
<i>B. garinii</i>	3	0	0,0%	0	0,0%
<i>B. garinii</i>	4	5	20,0%	0	0,0%
<i>B. garinii</i>	5	0	0,0%	0	0,0%
<i>B. garinii</i>	6	3	12,0%	0	0,0%
<i>B. garinii</i>	7	2	8,0%	0	0,0%
<i>B. garinii</i>	8	-	-	-	-
<i>B. valaisiana</i>		6	24,0%	0	0,0%
A14S		1	4,0%	0	0,0%

4.2.5 Mischinfektionen

Anhand der Bandenmuster des Restriktionsenzymverdaus konnten zudem noch Mehrfachinfektionen ermittelt werden. Die RFLP-Muster von Infektionen mit mehr als einer Borrelien-Spezies, bzw. mehr als einem Borrelien-OspA-Typ, entsprechen der Kombination der charakteristischen Einzelbilder (Abb. 12).

In dieser Studie konnten bei nüchternen *I. ricinus* Zecken folgende Doppelinfektionen ermittelt werden: aus dem Englischen Garten von OspA-Typ 2 und A14S, aus Passau 2 Mischinfektionen von *B. valaisiana* und A14S, und aus den Isar Auen je eine Doppelinfektion von OspA-Typ 1 und -2 und *B. valaisiana* und OspA-Typ 6. In den Isar Auen wurde außerdem eine Dreifachinfektion mit OspA-Typ 2, -4 und A14S gefunden. Bei den gesaugten Zecken von Hunden gab es eine Mischinfektion von *B. valaisiana* und A14S.

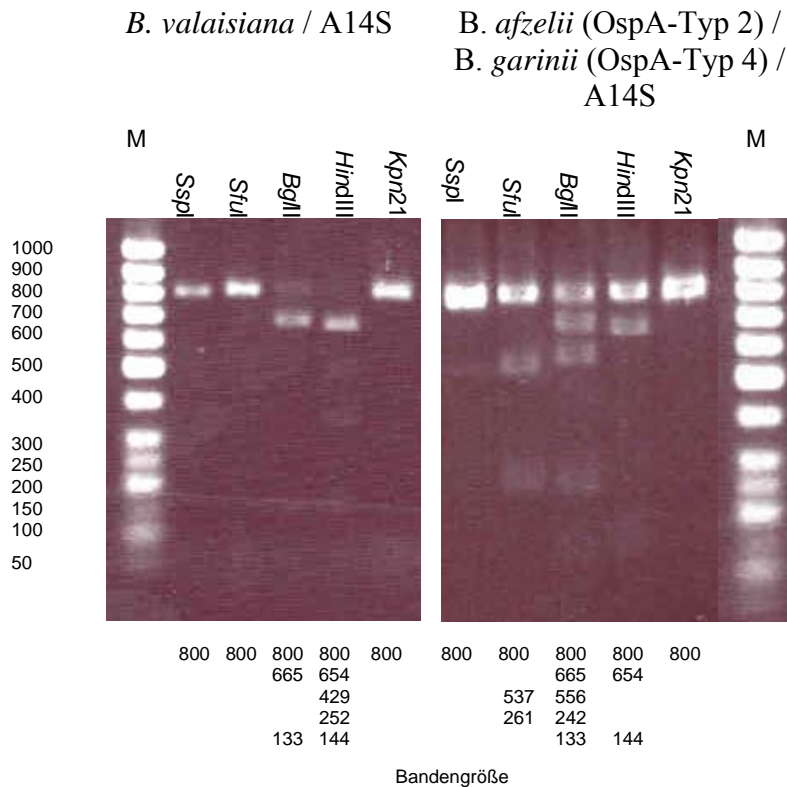
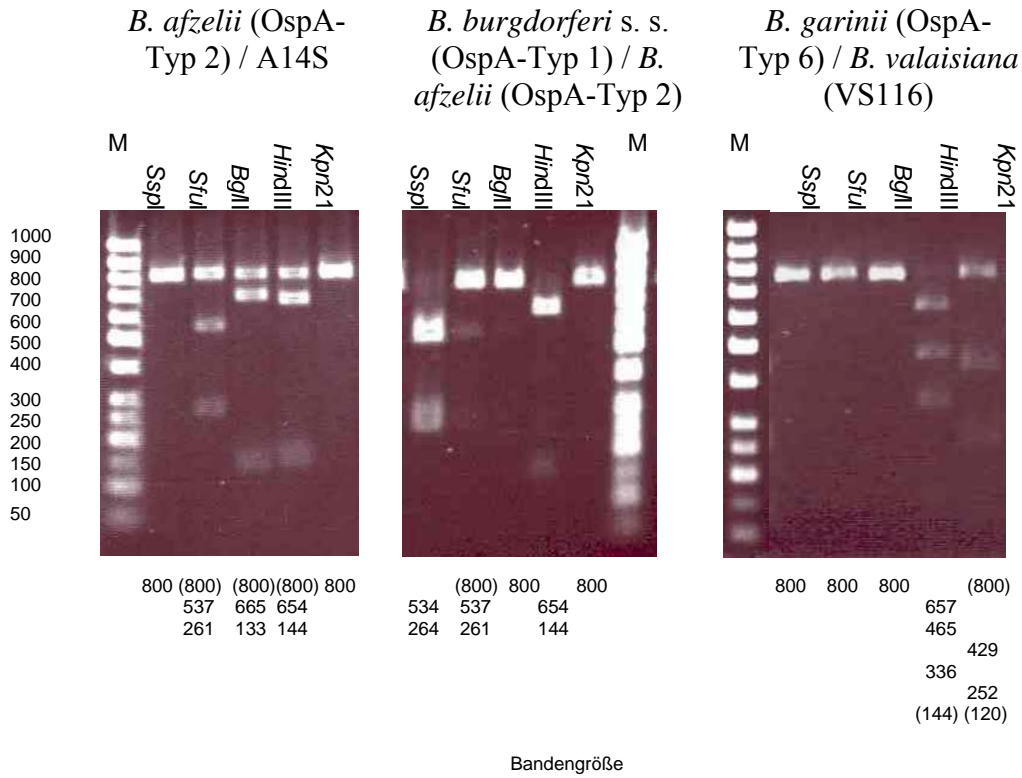


Abbildung 12: RFLP-Muster von Mischinfektionen mit mehreren Spezies bzw. OspA-Typen von *B. burgdorferi* sensu lato. Das Schnittbild der Doppelinfektionen bzw. der Dreifachinfektion entspricht einer Mischung aus zwei bzw. drei Einzelschnittbildern. M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

4.3 Klonierung und Sequenzierung des *fla*-PCR-Amplifikats

Von insgesamt 272 in der *fla*-Real-Time PCR positiven DNA-Proben nüchterner und gesaugter Zecken, konnten 26 in der *ospA*-PCR nicht bestätigt werden. Das *fla*-Amplifikat von fünf dieser in der *ospA*-PCR negativen Proben, wurde daraufhin in den PCRII Vektor kloniert. Dadurch war eine vollständige Sequenzierung des Amplifikats mit Vektor-spezifischen Primern möglich (Kap. 3.12).

Vier Klone wiesen Inserts mit der korrekten Länge von 170 Bp auf und wurden durch Sequenzvergleiche als *B. garinii* Stamm IP90 identifiziert. Die Sequenzierung eines Amplifikats ergab ein Insert mit der Länge von 70 Bp und eine unspezifische Sequenz, welche keinem in der Gendatenbank registriertem Erreger zugeordnet werden konnte. Die ursprüngliche DNA-Probe dieses PCR-Produkts war in der *fla*-Real-Time PCR als grenzwertig-positiv gewertet worden. Die Sequenzen von IP90 wurden am Max von Pettenkofer-Institut, Nationales Referenzzentrum für Borreliose, ermittelt und sind bisher noch nicht in der Gendatenbank registriert.

4.4 Prävalenz von *A. phagocytophilum* in *I. ricinus*

Der Nachweis von *A. phagocytophilum* erfolgte mit TaqMan Sonden in einer Real-Time PCR, wobei das Protokoll von Courtney et al. (2004) als Referenzmethode gewählt wurde. Die PCR wurde dann als positiv gewertet, wenn ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz bis zum 40. Amplifikationszyklus erfolgte (Abb.13).

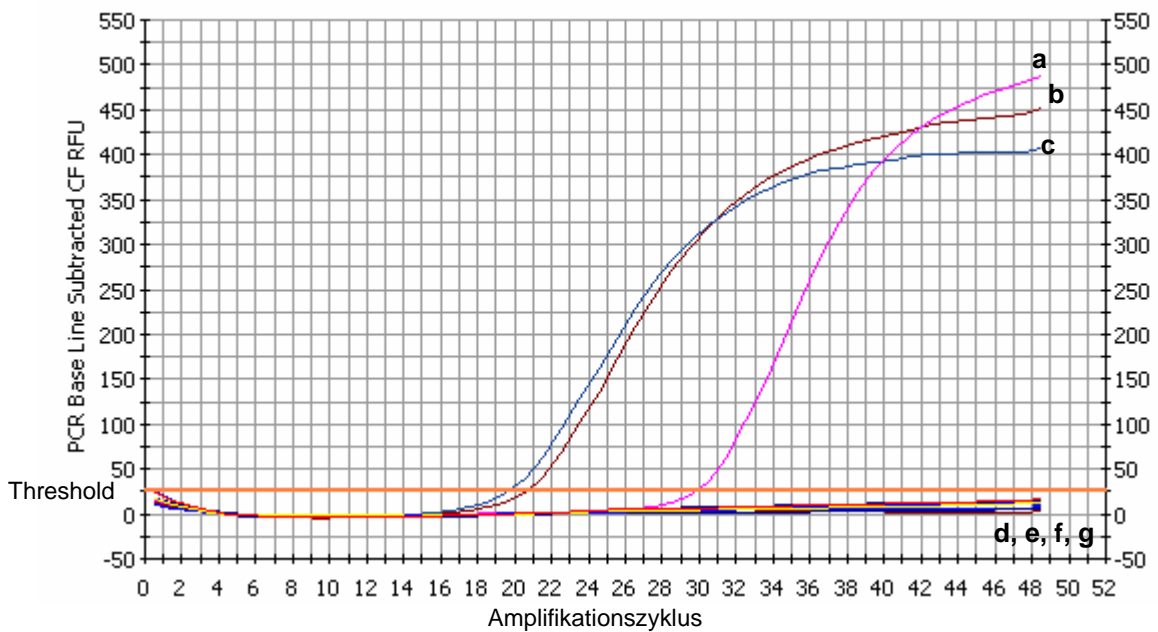


Abbildung 13: *msp2*-Real-Time PCR: Darstellung der Amplifikation in Form von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU). a) und c) stellen den Kurvenverlauf der *msp2*-positiven Proben Zecke Nr. 26 bzw. 34 aus den Isar Auen und b) den der Positivkontrolle dar. d), e), f), und g) zeigen *msp2*-negative Proben der Zecken Nr. 30, 31, 32 bzw. 33 aus den Isar Auen und h) die Negativkontrolle.

4.4.1 Prävalenz in nüchternen und gesaugten Zecken

Zunächst wurden 625 DNA-Proben nüchterner und 300 DNA-Proben gesaugter *I. ricinus* Zecken nach einem Real-Time PCR Protokoll von Pusterla et al. (1999) auf eine Infektion mit *A. phagocytophilum* untersucht (Kap. 3.13.1). Als Target diente das 16Sr-RNA-Gen. Dabei wurde für nüchterne Zecken eine ungewöhnlich hohe Prävalenz von 10,7% (8,3% bis 13,3%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) (Tab. 39), für gesaugte Zecken von Hunden eine Prävalenz von 6,2% (3,6% bis 9,1%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) und für gesaugte Zecken von Rindern eine Prävalenz von 64,0% (44,0% bis 84,0%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) ermittelt (Tab. 40).

Die Überprüfung der Spezifität dieser PCR mit DNA von *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *E. risticii*, *E. canis* und aus Zecken extrahierter Wolbachien-DNA ergab, dass bis auf *E. canis* alle der genannten Erreger detektierbar waren. Ein Vergleich der Sequenzen von Primer und Sonde dieser PCR mit in der Gendatenbank registrierten Sequenzen von

Wolbachia spp. und *E. risticii*, *E. canis* ergab zudem, dass die verwendeten Oligonukleotide auch Wolbachien nachweisen können.

Um unerwünschte Kreuzreaktionen auszuschließen, wurde als Referenz ein anderes Real-Time PCR Protokoll verwendet, in dem das *msp2*-Gen von *A. phagocytophilum* die Zielsequenz darstellt (Courtney et al., 2004).

Die errechneten Prävalenzen lagen für die nüchternen *I. ricinus* bei 4,5 % (2,9% bis 6,2%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung). Die Auswertung der Prävalenzen erfolgte bei den nüchternen Zecken in Bezug auf das Sammelgebiet. Für das Gebiet im Englischen Garten konnte dabei eine Durchseuchungsrate von 8,7% (4,8% bis 12,6%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) ermittelt werden, während die Prävalenzen für das Gebiet in den Isar Auen bei 3,9% (1,5% bis 6,8%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) und in Passau bei 1% (0,0% bis 2,4%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) lagen (Tab. 41, Abb. 14). Beim Vergleich der einzelnen Prävalenzen mit den jeweils anderen Gebieten, konnte für das Gebiet im Englischen Garten ein hochsignifikant höherer Wert (Chi²-Test: p =0,1%), für das Gebiet in den Isar Auen kein signifikanter Unterschied (Chi²-Test: p =75,1), und für das Gebiet in Passau einen hochsignifikant niedriger Wert (Chi²-Test: p =0,5%) ermittelt werden (Abb. 14).

Tabelle 39: Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in den angewandten PCRs, dargestellt in Bezug auf Herkunft, Geschlecht und Infektion von nüchternen Zecken

	Gesamt		weiblich				männlich			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
Englischer Garten										
16Sr-Real-Time PCR	28	13,5	9,2-18,4	14	15,9	9,1-23,9	14	11,8	6,7-17,7	
<i>msp2</i> -Real-Time PCR	18	8,7	4,8-12,6	7	8,0	2,3-13,6	11	9,2	4,2-15,1	
16Sr-nested PCR	18	8,7	4,8-12,6	7	8,0	2,3-13,6	11	9,2	4,2-15,1	
Isar Auen										
16Sr-Real-Time PCR	18	8,7	4,8-12,6	10	11,1	5,6-17,8	8	6,8	2,6-12,0	
<i>msp2</i> -Real-Time PCR	8	3,9	1,5-6,8	4	4,4	1,1-8,9	4	3,4	0,9-6,8	
16Sr-nested PCR	7	3,4	1,0-5,8	3	3,3	0,0-7,8	4	3,4	0,9-6,8	
Passau										
16Sr-Real-Time PCR	21	10,0	6,2-14,2	19	11,7	6,8-16,7	2	4,1	0,0-10,2	
<i>msp2</i> -Real-Time PCR	2	1,0	0,0-2,4	2	1,3	0,0-3,1	0,0	0,0	0,0	
16Sr-nested PCR	2	1,0	0,0-2,4	2	1,3	0,0-3,1	0,0	0,0	0,0	

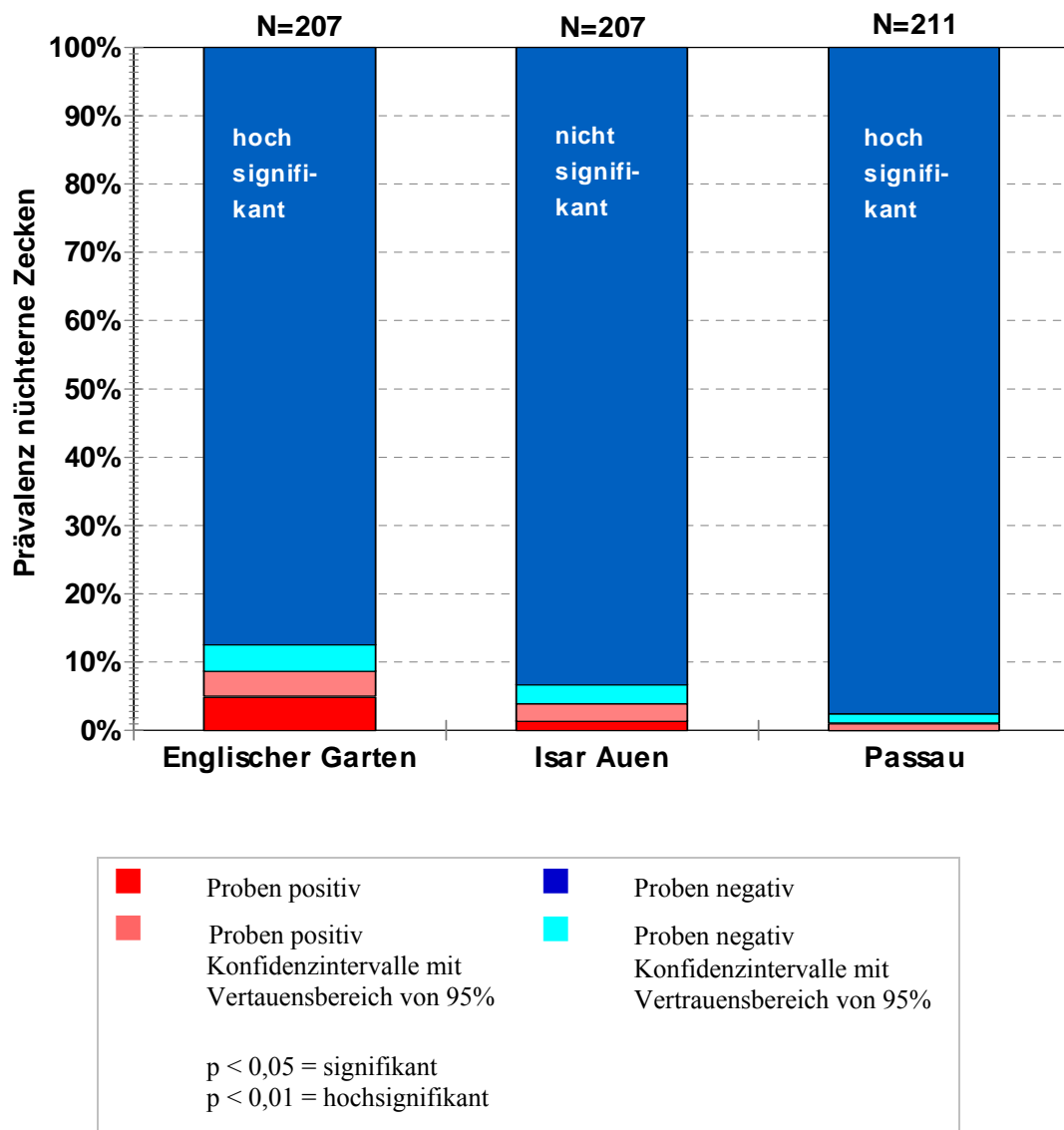


Abbildung 14: Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in nüchternen *I. ricinus* Zecken der Sammelgebiete Englischer Garten, Isar Auen und Passau und Ergebnis des Vergleichs der Prävalenzen dieser Gebiete.

Bei den von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg abgesammelten Zecken wurde eine Durchseuchungsrate von 4,7% (2,6% bis 7,3%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) ermittelt. Bei den von Rindern aus einem Endemiegebiet für *A. phagocytophilum* in der Schweiz abgesammelten Zecken ergab sich dagegen eine Prävalenz von 60,0% (40,0% bis 80,0%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) (Tab. 40).

Tabelle 40: Prävalenzen von *A. phagocytophilum* in den angewandten PCRs in Bezug auf Herkunft, Geschlecht und Infektion von gesaugten Zecken von Hunden und Rindern.

gesaugte Zecken	Hund		95% Konfidenz-intervall	Rind		95% Konfidenz-intervall
	n	%		n	%	
16Sr-Real-Time PCR	17	6,2	3,6-9,1	16	64,0	44,0-84,0
<i>msp2</i> -Real-Time PCR	13	4,7	2,6-7,3	15	60,0	40,0-80,0
16Sr-nested PCR	13	4,7	2,6-7,3	15	60,0	40,0-80,0

4.4.2 Bestätigung der Prävalenzen

Zur Bestätigung der in der *msp2*-Real-Time PCR ermittelten Ergebnisse, wurden die 28 positiven und 45 negative DNA-Proben zusätzlich mit einer etablierten nested PCR (Massung et al., 1998) getestet (Kap.3.13.3). Bis auf eine positive Probe konnten alle in der *msp2*-Real-Time PCR positiven DNA-Proben und die 45 ausgewählten negativen Proben durch die 16Sr-RNA-PCR bestätigt werden (Nachweis des 546 Bp großen Amplifikats, siehe Abb.15).

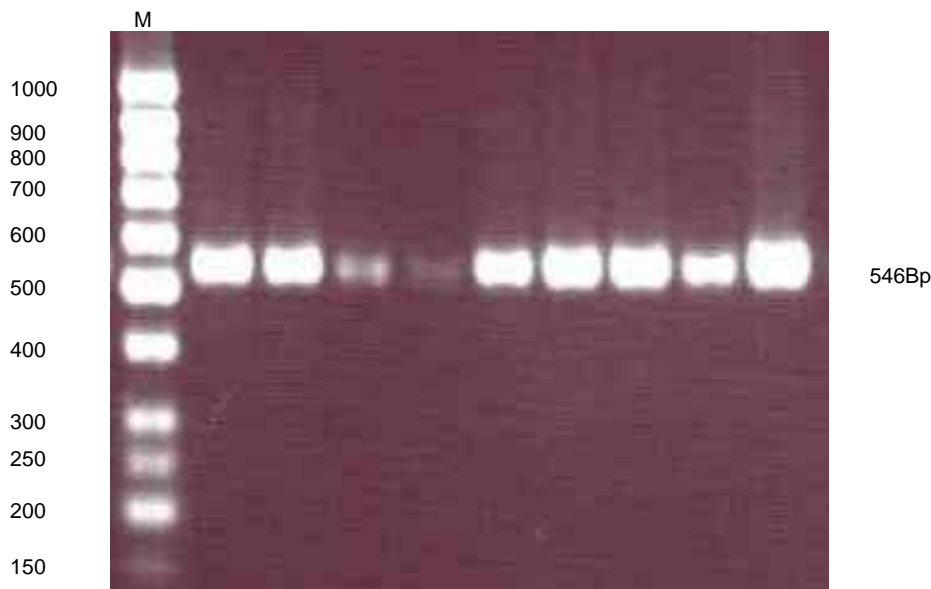


Abbildung 15: Agarosegel mit 546 Bp großen Banden des 16Sr-DNA-Amplifikats von *A. phagocytophilum* aus gesaugten Zecken (Nr. 243, 245, 246, 249, 250, 251, 255 und 256). M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

4.4.3 Ergebnisse Sequenzierung

Die Sequenzanalyse von drei *msp2*- bzw. 16Sr-DNA-positiven Proben ergab eine 100 %ige Homologie mit den *A. phagocytophilum*-Isolaten „Frankonia 2“ (accession no. AF136712) und „Long Point“ (accession no. AF311343).

4.5 Prävalenz von *Babesia* spp. in *I. ricinus*

Zur Detektion von Piroplasmen wurde eine Real-Time PCR (Zahler-Rinder M., unveröffentlicht) angewandt, mit welcher die 18Sr-DNA von Babesien, Theilerien und Hepatozoon amplifiziert werden kann (Kap. 3.14). Dabei wurde für die nüchternen Zecken eine Infektionsrate von 1,3% (8 von 625) ermittelt. In Bezug auf die Sammelgebiete konnte eine positive Probe im Englischen Garten, 4 in den Isar Auen und 3 in Passau ermittelt werden. Zudem wurde in 5,1% (14 von 275) der gesaugten Zecken von Hunden eine Infektion mit Piroplasmen detektiert, während dieser Erreger in gesaugten Zecken von Rindern nicht nachgewiesen werden konnte.

4.6 Koinfektionen

Koinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* konnten bei nüchternen Zecken mit einer Prävalenz von 1,1% (0,3% bis 2,1%; Vertrauensbereich 95%; Binomialverteilung) festgestellt werden. Des Weiteren konnten noch bei 2 von 625 (0,3 %) nüchternen Zecken Koinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato und Piroplasmen detektiert werden (Tab. 41).

Bei 2 von 275 (0,7%) gesaugten Zecken von Hunden konnte eine Doppelinfektion von *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* detektiert werden (Tab. 41), während bei gesaugten Zecken von Rindern keine simultane Infektion mit mehreren Erregern nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 41: Koinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* und Piroplasmen in den untersuchten nüchternen und an Hunden gesaugten Zecken.

Herkunft	Erreger	Anzahl
Englischer Garten	OspA-Typ 2 / <i>A. phagocytophilum</i>	5
	A14S / <i>A. phagocytophilum</i>	1
	OspA-Typ 1 / Piroplasmen	1
Isar Auen	M53 (<i>B. valaisiana</i>) / <i>A. phagocytophilum</i>	1
	OspA-Typ 3 / Piroplasmen	1
gesaugte Zecken Hund	OspA-Typ 2 / <i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	1
	OspA-Typ 3 / <i>A. phagocytophilum</i>	1

5 Diskussion

5.1 *B. burgdorferi sensu lato*

5.1.1 Prävalenz

In der vorliegenden Studie wurde für adulte nüchterne Zecken aus Süd-Bayern eine Durchseuchungsrate von 35,4% ermittelt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Prävalenzen der drei Sammelgebiete im Englischen Garten (37,2%), in den Isar Auen (35,8%) und in Vilshofen (33,2%) festgestellt werden konnte. Ähnlich hohe Durchseuchungsraten wurden auch schon in vorherigen Studien für adulte *I. ricinus* Zecken aus dem Englischen Garten (Fingerle et al., 1994 und 1999a; Michel et al., 2003), der Umgebung von München und Ulm (Fingerle et al., 1999a, Michel et al., 2003) und für Konstanz (Rauter et al., 2002) dokumentiert, während die Prävalenzen für juvenile Stadien meist niedriger waren (siehe Kap. 2.3.2.2). Beim Vergleich von Prävalenzwerten müssen immer die Anteile der Zeckenstadien sowie die Gesamtanzahl der untersuchten Zecken und die unterschiedlichen Nachweismethoden berücksichtigt werden, da diese Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Die ermittelten hohen Durchseuchungsraten der nüchternen Zecken scheinen von besonderer Bedeutung, da in der durchgeführten Studie ausschließlich adulte Zecken, also das Entwicklungsstadium, welches den Großteil des Zeckenbefalls von Mensch-, Haus- und Nutztieren ausmacht (Anderson 1989, Gern et al., 1998, Grey et al., 1998), untersucht wurden. Diese Ergebnisse bestätigen zudem die Annahme, dass Zecken eine Infektion mit *B. burgdorferi sensu lato* erst durch die Blutmahlzeit im Laufe ihrer Entwicklung erwerben. Diese Spirochäten scheinen innerhalb der Zeckengeneration vor allem transstadial übertragen zu werden (siehe Kap. 2.3.2.2).

Bei Betrachtung der Prävalenzen von nüchternen männlichen und weiblichen *I. ricinus* der unterschiedlichen Regionen konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen, wie schon in vorangegangenen Studien aus Bayern dokumentiert (Fingerle et al., 1999a), kein signifikanter Unterschied zwischen den Prävalenzen der drei Sammelgebiete festgestellt werden.

Die Prävalenzen für *B. burgdorferi* sensu lato von gesaugten Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg (8,4%) und von Rindern aus der Schweiz (8,0%) lagen bei ähnlichen, im Vergleich zu nüchternen Zecken, auffallend niedrigeren Werten. Matuschka et al. (1993) beschrieben für ein Gebiet in Berlin ähnliche Unterschiede zwischen den Durchseuchungsraten von gesaugten Zecken von Rehen und nüchternen Zecken aus der Vegetation, und auch Baumgarten et al. (1999) konnten in gesaugten Zecken von Hunden und Rehen eine niedrigere Durchseuchungsrate mit Borrelien feststellen, als in Zecken, die zwar auch von diesen Tieren abgesammelt, aber noch nüchtern waren (siehe Kap. 2.3.2.4).

Für die unterschiedlichen Prävalenzen nüchterner und gesaugter Zecken der vorliegenden Arbeit sind drei Erklärungen denkbar. Zunächst muss berücksichtigt werden, dass 275 von 300 gesaugten Zecken von Hunden aus verschiedensten Regionen in Bayern und Baden-Württemberg stammen, während die nüchternen Zecken in drei ausgewählten Endemiegebieten in Bayern gesammelt wurden. In anderen Regionen von Süddeutschland könnten möglicherweise grundsätzlich niedrigere Durchseuchungsraten von Borrelien auftreten. Eine weitere Erklärung für die niedrigeren Borrelien-Prävalenzen bei gesaugten Zecken, im Vergleich zu nüchternen, könnte eine Elimination dieser Erreger durch entsprechende Antikörper aus dem Blut der Wirtstiere sein (siehe Kap. 2.3.2.1 und 2.3.2.4).

Niedrigere Prävalenzen bei gesaugten Zecken könnten zudem aus einer Inhibition der PCR resultieren. Blut-Bestandteile können eine Amplifikation von Erregern behindern (Schwartz et al., 1997) (siehe Kap. 2.4.1). In der vorliegenden Studie konnte eine prinzipielle Inhibition der PCR durch Überprüfung mit β -Aktin amplifizierenden Primern ausgeschlossen werden. Aktin ist ein strukturelles Element von zahlreichen Zellen, welches innerhalb der Spezies hochkonserviert ist. Seit kurzem sind die Nukleotidsequenzen von Aktin von *Haemaphysalis longicornis*, *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus* aber auch von *Ixodes scapularis* dokumentiert (da Silva Vaz Jr. et al., 2005). Da mit der angewandten PCR fast ausschließlich β -Aktin von Warmblütern vervielfacht werden kann, wäre es sinnvoll, basierend auf diesen neuen Sequenzen, eine Zecken-Aktin amplifizierende PCR zu konstruieren, die für weitere epidemiologische Studien als Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

5.1.2 Verteilung der Spezies und OspA-Typen von *B. burgdorferi sensu lato*

In Deutschland konnten bisher alle *B. burgdorferi sensu lato* Spezies bis auf *B. lusitaniae* mit unterschiedlicher Häufigkeit in *I. ricinus* nachgewiesen werden (siehe Kap. 2.3.2.3). In Süddeutschland wurden *B. garinii* und *B. afzelii* am häufigsten detektiert, gefolgt von *B. burgdorferi sensu stricto*, während *B. valaisiana* nur sehr selten gefunden wurde (Rauter et al., 2002; Michel et al., 2003). Im Gegensatz dazu stellte *B. valaisiana* die häufigste nachgewiesene Spezies in einer Studie im Siebengebirge dar (Kampen et al., 2004).

Ähnlich wie in den obigen Angaben war in der vorliegenden Arbeit bei nüchternen Zecken *B. afzelii* die am häufigsten gefundene Spezies, gefolgt von *B. burgdorferi sensu stricto* und *B. garinii*. Im Vergleich zu einer vorangegangenen Studie aus Bayern (Michel et al., 2003), wo *B. valaisiana* nur vereinzelt nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 2.3.2.3), wurde für diese Spezies hier mit 19,9% eine deutlich höhere Prävalenz ermittelt. Obwohl A14S hochsignifikant seltener als alle anderen Spezies vorkam, konnte diese ‚neue‘ *Borrelia*-Spezies in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu früheren Studien, wo sie nur vereinzelt gefunden wurde (Rauter et al., 2002; Michel et al., 2003), mit 9,5% hier relativ häufig nachgewiesen werden.

In Bezug auf die Sammelgebiete konnten vor allem *B. garinii*, *B. afzelii* und auch *B. burgdorferi sensu stricto* mit sehr unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.2.3). Auffallend war, dass *B. valaisiana* die zweithäufigste nachgewiesene Spezies im Gebiet bei Passau war. Eine mögliche Erklärung für diese lokal unterschiedlichen Ergebnisse ist eine gewisse Wirtspräferenz der einzelnen *Borrelia*-Genospezies sowie das Vorhandensein unterschiedlicher Populationen von Wirtstieren (siehe Kap. 2.3.2.1). Für *B. garinii* und *B. valaisiana* wird hauptsächlich ein Zecken – Vogel Transmissionszyklus diskutiert (Olsen et al., 1995), während für *B. afzelii* wahrscheinlich *Apodemus*-Mäuse und andere Nager die wichtigsten Reserviertiere darstellen (Humair et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998; Richter et al., 2004a). Für die neuerdings beschriebene Spezies A14S vermuteten Richter et al. (2004b) eine Wirtsspezifität für *Gliridae* (Schläfer), da A14S häufig in *Eliomys quercinus* (Gartenschläfer) und *Muscardinus avellanarius* (Haselmaus), aber im Gegensatz zu *B. afzelii* nicht in *Apodemus sylvaticus* (Waldmaus) nachgewiesen werden konnte. Zudem schien sich die Verbreitung dieser Spezies auf bestimmte Gebiete zu beschränken. Ähnlich konnte auch in der vorliegenden Studie A14S mit 18,2% relativ häufig in Zecken aus dem Englischen Garten und wesentlich seltener in den anderen zwei Sammelgebieten

nachgewiesen werden. Die Erklärung für dieses Ergebnis könnte, entsprechend den von Richter et al. (2004b) dokumentierten Beobachtungen, die aus der unterschiedlichen Vegetation der drei Sammelgebiete resultierenden Habitats unterschiedlicher Wirtstierpopulationen sein (siehe Kap. 2.3.2.1).

Wie bereits in Kap. 2.1.1.4 dargestellt, ist in Europa neben der Verteilung der Spezies von *B. burgdorferi* sensu lato auch die Differenzierung von *B. garinii* in die OspA-Typen von großer Bedeutung. Bisher existieren aber nur wenige Daten zur Prävalenz der OspA-Typen in nüchternen Zecken oder Patientenmaterial. Wilske et al. (1996a) konnten in Zecken und in Liquor von Patienten mit Neuroborreliose häufig den OspA-Typ 6 finden, während OspA-Typ 4 zwar auch in Patientenmaterial, aber nicht in Zeckenisolaten detektiert werden konnte. In Untersuchungen an Zecken aus dem Raum München und Bad Tölz konnten Michel et al. (2003) am Häufigsten den OspA-Typ 6, und im Gegensatz zu Wilske et al. (1996a) auch den OspA-Typ 4 mit einer relativ hohen Prävalenz nachweisen, während die Typen 3 und 5 seltener vorkamen. In Übereinstimmung mit letzteren Ergebnissen war in der vorliegenden Arbeit in nüchternen Zecken OspA-Typ 6 der am häufigsten gefundene OspA-Typ, die Typen 3 und 5 waren seltener und OspA-Typ 4 und 8 konnte in nur zwei bzw. einer Zecke nachgewiesen werden.

Bisher liegen noch keine Vergleichsdaten zur Verteilung der *B. burgdorferi* sensu lato Spezies in gesaugten Zecken vom Tier vor. In der vorliegenden Studie konnten jedoch Unterschiede bezüglich der Nachweishäufigkeit von *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen beim Vergleich von nüchternen und gesaugten Zecken festgestellt werden, da *B. garinii* mit den OspA-Typen 3, 5 und 6 die am häufigsten detektierte Spezies in gesaugten Zecken von Hunden darstellte, gefolgt von *B. valaisiana* und *B. burgdorferi* sensu stricto. Während bei nüchternen Zecken *B. afzelii* am häufigsten detektiert wurde, kam diese Spezies in den gesaugten Zecken von Hunden deutlich seltener vor und konnte, wie *B. burgdorferi* sensu stricto, in gesaugten Zecken von Rindern nur einmalig nachgewiesen werden. Auch A14S konnte nur bei einer gesaugten Zecke vom Hund detektiert werden (siehe Kap. 4.2.1).

Wie in der Studie von Michel et al. (2003) konnten weder in nüchternen noch in gesaugten Zecken OspA-Typ 7 oder *B. lusitaniae* nachgewiesen werden.

Somit ergab sich insgesamt für die nüchternen Zecken der drei Sammelgebiete in München und bei Passau ein heterogeneres Verteilungsbild von OspA-Typen als für gesaugte

Zecken von Hunden aus verschiedenen Regionen in Bayern und Baden-Württemberg. Dies könnte möglicherweise auf eine unterschiedliche Verbreitung der *OspA*-Typen von *B. garinii* in verschiedenen Regionen von Süddeutschland hinweisen.

5.1.3 Vergleich der *fla*-Real-Time PCR und der *ospA*-PCR

Zum Nachweis von Borrelien wurden zwei unterschiedliche einander ergänzende molekulargenetische Nachweisverfahren angewandt (siehe Kap. 3.11). Dabei konnten 9,6% (26 von 272) der *fla*-Real-Time PCR positiven Proben auch nach wiederholtem Testen in der *ospA*-PCR nicht bestätigt werden. Die Ursache dieser Differenz ist sehr wahrscheinlich eine unterschiedliche Spezifität der verwendeten Nachweisverfahren.

Dafür spricht, dass die Klone von *fla*-PCR positiven Proben, die in der *ospA*-PCR zweifach als negativ gewertet wurden, durch Sequenzanalyse als *B. garinii* Stamm IP90 identifiziert werden konnten. Zudem ergab ein Vergleich der Sequenzen der Oligonukleotide der *ospA*-PCR mit den Sequenzen des *B. garinii* Stamms IP90, dass zwei reverse primer unter den gewählten Bedingungen nicht mit dem *ospA*-Gen dieser Borrelien hybridisieren können. Ein Sequenzvergleich von Primern und der Sonde der *fla*-Real-Time PCR (Schwaiger et al., 2001) mit weiteren aus der Datenbank zur Verfügung stehenden Sequenzen zeigte ausserdem, dass mit dieser PCR auch *Borrelia*-Spezies außerhalb des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes, wie *B. miyamotoi*, *B. recurrentis*, und *B. duttoni* amplifiziert werden können. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass mit der *fla*-PCR Borrelien detektiert wurden, die mit den in der *ospA*-PCR eingesetzten Primern nicht nachweisbar sind.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der zwei angewandten Methoden, könnte aber auch der Nachweis von unspezifischen PCR-Produkten in der *fla*-PCR sein. Zumindest konnte ein unspezifisches Amplifikat nach Klonierung und Sequenzierung einer in der *fla*-PCR als grenzwertig positiv beurteilten Probe ermittelt werden. Dieses Ergebnis weist somit auch auf die Schwierigkeit bei der Beurteilung der in der Real-Time PCR erhaltenen grenzwertigen Ergebnisse hin. Dabei kann die Ursache für ein schwaches Fluoreszenzsignal neben einer sehr geringen Menge von zu amplifizierender DNA, eine unspezifische Fluoreszenzreaktion sein.

Die Sensitivität der angewandten das *ospA*-Gen detektierenden semi-nested PCR liegt für *B. afzelii* bei 5 Borrelien/PCR und für alle anderen Spezies des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes bei 1 Borrelie/PCR (Michel et al., 2003), in der *fla*-Real-Time PCR können weniger als 10 Kopien mit der Sequenz des *fla*-Gens von *B. burgdorferi* sensu lato

detektiert werden können (Schwaiger et al., 2001). Damit sind die beiden Methoden in ihrer Sensitivität vergleichbar, was durch die hier erzielten Ergebnisse bestätigt wurde, da lediglich eine von 90 in der Real-Time PCR als negativ beurteilten DNA-Proben in der semi-nested PCR ein positives Ergebnis zeigte. Bei dieser einen Probe könnte vermutlich eine so geringe Menge an Erreger-DNA vorhanden gewesen sein, dass deren Amplifikation nur mit der etwas sensitiveren semi-nested PCR möglich war.

Das Wissen um die unterschiedliche Spezifität der hier angewandten Nachweismethoden (siehe Kap. 3.11.1 und 3.11.2) ist für epidemiologische Studien, aber auch für die Diagnostik von großer Bedeutung, da mit der *ospA*-PCR neben Borrelien außerhalb des *B. burgdorferi* sensu lato Komplexes offensichtlich auch, wie in dieser Studie erwiesen, ein Stamm einer humanpathogenen Spezies, wie IP90 von *B. garinii*, nicht erfasst wird. Daher bleibt zu überprüfen, inwiefern dies möglicherweise auch noch auf andere Borrelien-Stämme oder sogar -Spezies zutrifft, da gerade für die diagnostischen Verwendung solcher Nachweismethoden, neben einer hohen Sensitivität vor allem auch eine hohe Spezifität bezüglich der pathogenen Erregerspezies/*B. burgdorferi* sensu lato spp. und der zugehörigen Stämme erforderlich ist.

Die hier angewandte *fla*-Real-Time PCR scheint sich aufgrund der beschriebenen Spezifität und einer, mit nested PCR's vergleichbaren, hohen Sensitivität gut als 'screening' PCR für epidemiologische Studien von durch Zecken übertragenen Erregern zu eignen. Um in Zukunft die Interpretation der *fla*-Real-Time PCR Ergebnisse zu erleichtern und zu präzisieren, müssten Zecken mit den entsprechenden Erregern experimentell infiziert werden, und die extrahierte DNA mit einer Quantifizierung in der *fla*-Real-Time PCR getestet werden. Da mit dieser PCR aber noch keine Determination der einzelnen Borrelien-Spezies oder OspA-Typen möglich ist, sind weitere Schritte zur Differenzierung nötig. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *ospA*-PCR mit anschließender RFLP-Analyse stellen sehr zuverlässige aber relativ zeit- und kostenintensive Verfahren dar, so dass andere PCR-Methoden zur Spezifizierung in Erwägung gezogen werden sollten.

Eine von Rauter et al. (2002) entwickelte auf dem *ospA*-Gen basierende Real-Time PCR, ermöglichte zwar durch anschließende Schmelzpunktanalyse neben der Detektion der drei humanpathogenen Borrelien Spezies auch eine Differenzierung von *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto, ein separater Nachweis von *B. afzelii* war aber nicht möglich, da diese Spezies den gleichen Schmelzpunkt wie *B. valaisiana* hat. Daher wäre die Entwicklung einer Multiplex-Real-Time PCR mit verschiedenen Spezies-spezifischen Sonden erstrebenswert. Solch ein komplexes Real-Time PCR-System könnte einen

schnellen und dennoch sehr sensitiven und spezifischen simultanen Nachweis der *B. burgdorferi* sensu lato spp. ermöglichen.

5.2 *A. phagocytophilum*

5.2.1 Prävalenz

Für insgesamt 625 nüchterne *I. ricinus* Zecken aus den drei ausgewählten Sammelgebieten in Bayern konnte mit der *msp2*-PCR nach Courtney et al. (2004) eine Prävalenz von 4,5% für *A. phagocytophilum* ermittelt werden. Die Durchseuchungsraten der nüchternen Zecken sind damit auf den ersten Blick höher als die in vorherigen Studien für Bayern (Fingerle et al., 1999a), oder auch die für andere Gebiete in Süd- und Mitteldeutschland (Baumgarten et al., 1999; Hartelt et al., 2003; Hildebrandt et al., 2003) dokumentierten Prävalenzen (siehe Kap.2.3.3.3). Im Vergleich zu vorangegangenen Studien, wo für adulte Zecken aus dem Englischen Garten eine Durchseuchungsrate von 2,6% festgestellt wurde (Fingerle et al., 1999a), lag die in der vorliegenden Studie ermittelte Prävalenz von 8,7% im Englischen Garten auffallend hoch. Beim Vergleich der Prävalenzen muß allerdings berücksichtigt werden, dass in der vorliegenden Studie ausschließlich adulte Zecken untersucht wurden. Es wird vermutet, dass bei der Verbreitung von *A. phagocytophilum*, ähnlich wie bei Borrelien, vor allem eine transstadiale Übertragung innerhalb der Zeckenpopulation stattfindet, und dass daher adulte Zecken meist eine höhere Infektionsrate mit diesen Erregern als die juvenilen Entwicklungsstadien zeigen (siehe Kap. 2.3.3.3)

Der beim Vergleich der Prävalenzen für das Gebiet im Englischen Garten ermittelte hochsignifikant höhere und der für Passau ermittelte hochsignifikant niedrigere Wert, unterstützten zudem die Vermutung, dass *A. phagocytophilum* in Deutschland eine fokale Verbreitung aufweist (Fingerle et al., 1999a; Hildebrandt et al., 2002).

Bei gesaugten Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg ergab sich mit 4,7% eine ähnliche Prävalenz für *A. phagocytophilum* wie bei nüchternen Zecken, während für gesaugte Zecken von Rindern eine Prävalenz von 60,0% ermittelt werden konnte. Die letztgenannte hohe Prävalenz resultiert vermutlich daraus, dass diese gesaugten Zecken

von Rindern stammten, die eine Infektion mit *A. phagocytophilum* aufwiesen. Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls aus der Schweiz von Pusterla et al. (1998b) dokumentiert. In einem Gebiet, welches als endemisch für bovine Ehrlichiose gilt, konnte in gesaugten Zecken von an Ehrlichiose erkrankten Rindern wesentlich häufiger eine Infektion mit *A. phagocytophilum* als in gesaugten Zecken von gesunden Rindern, oder in nüchternen Zecken, die von der Vegetation stammten, nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen und die Detektion hoher Infektionsraten von Wiederkäuern mit *A. phagocytophilum* (Schouls et al., 1999; Liz et al., 2002) lassen vermuten, dass diese Tiergruppen ein Reservoir für diesen Erreger darstellen könnten. Eine weitere mögliche Erklärung für die hohen Durchseuchungsraten dieser Zecken wäre, dass nach der Blutmahlzeit eine Vermehrung der Erreger im Vektor stattgefunden hat (siehe Kap. 2.3.3.3).

Bezüglich der gesaugten Zecken von Hunden ist unbekannt, ob diese Tiere mit *A. phagocytophilum* infiziert waren. Die in dieser Studie ermittelte Prävalenz von 4,7% lag vergleichsweise höher, als die von Baumgarten et al. (1999) aus Baden-Württemberg und Franken dokumentierte Durchseuchungsrate von 2,2%, welche bei gesaugten Zecken von Hunden, die keine Infektion mit *A. phagocytophilum* aufwiesen, ermittelt wurde.

Die anhand der Sequenzierung identifizierten Stämme „Frankonia 2“ und „Long Point“ sind Varianten von *A. phagocytophilum*, wobei „Frankonia 2“ bereits in gesaugten Zecken von Rehen und Hunden aus Franken und Baden-Württemberg von Baumgarten et al. (1999) dokumentiert wurde.

5.2.2 Vergleich der 16Sr-DNA- und der *msp2*-Real-Time PCR

Mit der 16Sr-Real-Time PCR nach Pusterla et al (1999) wurde zunächst eine Durchseuchungsrate von 10,7% für nüchterne Zecken und von 11,0% für gesaugte Zecken ermittelt. Diese Durchseuchungsraten lagen damit deutlich höher, als die bisher in Deutschland beschriebenen (siehe Kap. 2.3.3.3). Da eine Überprüfung der Spezifität dieser PCR ergab, dass mit den verwendeten Oligonukleotiden auch DNA von Rickettsien außerhalb der *A. phagocytophilum*-Gruppe amplifiziert werden kann (siehe Kap. 4.4.1), konnten die in dieser PCR ermittelten Ergebnisse nicht weiter verwendet werden. Daher wurde zum Nachweis von *A. phagocytophilum* eine zweite PCR nach einem Protokoll von

Courtney et al. (2004) angewandt, welche das für *Anaplasma* spezifische *msp2*-Gen als Zielsequenz hat, mit dem Ergebnis, dass bei den nüchternen Zecken eine Prävalenz von 4,5%, und bei den gesaugten Zecken von Hunden eine Prävalenz von 4,7% und bei den gesaugten Zecken von Rindern eine Prävalenz von 60,0% ermittelt wurde. Da alle in der *msp2*-Real-Time PCR (Courtney et al., 2004) ermittelten Ergebnisse durch eine spezifische konventionelle nested 16Sr-PCR (Massung et al., 1998) bestätigt werden konnten und beide PCRs über eine vergleichbare Sensitivität verfügen (siehe Kap. 3.13.2 und 3.13.3), wurde die *msp2*-Real-Time PCR als Referenzmethode gewählt.

Im Gegensatz dazu bestärkten die primär in der PCR nach Pusterla et al. (1999) ermittelten höheren Prävalenzen und deren Kreuzreaktivität mit Erregern außerhalb der *A. phagocytophilum*-Gruppe, wie unter anderem mit Wolbachien, den Verdacht, dass mit diesem Protokoll auch andere Erreger als *A. phagocytophilum* in den untersuchten *I. ricinus* nachgewiesen wurden. Diese Vermutung beruht unter anderem darauf, dass Zecken eine Vielzahl pathogener und apathogener Erreger wie auch Rickettsien und Wolbachien beherbergen können, und Wolbachien Endosymbionten darstellen, die regelmäßig in einem großen Spektrum von Parasiten, so auch in Zecken, vorzufinden sind (Noda et al., 1997; Fenollar et al., 2003). Zudem konnten Hartelt et al., (2003) in einer Studie in Baden-Württemberg in 0,9% der untersuchten *I. ricinus* Zecken Wolbachien nachweisen. Die Prävalenz der gefundenen *A. phagocytophilum* lag bei 1%. Außerdem konnte bei 8,9% der Zecken eine Infektion mit *Rickettsia helvetica* nachgewiesen werden. Simser et al. (2002) fanden zudem *Rickettsia monacensis* in *I. ricinus* aus dem Englischen Garten.

5.3 Babesia spp.

In Mitteleuropa werden neben Lyme Borreliose, FSME und granulozytärer Ehrlichiose auch seltenere durch Zecken übertragene Erkrankungen wie die Bovine Babesiose dokumentiert (siehe Kap. 2.3.4.3). Da in Deutschland zudem *B. divergens* und *B. microti* vereinzelt in *I. ricinus* Zecken nachgewiesen werden konnten (siehe Kap. 2.3.4.4), wurden alle 625 nüchternen und 300 gesaugten Zecken der vorliegenden Studie mit einer „screening-PCR“ auf eine Infektion mit Piroplasmen untersucht (siehe Kap. 3.14). Dabei konnte in 1,3% der nüchternen Zecken eine Infektion mit Piroplasmen nachgewiesen werden. In Bezug auf die Sammelgebiete wurde eine infizierte Zecke im Englischen Garten (München), 4 in den Isar Auen (München) und 3 in Vilshofen (Passau) gefunden.

Bei den gesaugten Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg konnte dagegen in 5,1% eine Infektion mit Piroplasmen detektiert werden, während kein Nachweis dieser Erreger in gesaugten Zecken von Rindern möglich war.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass mit der angewandten PCR die 18Sr-DNA von Babesien, Theilerien und Hepatozoon amplifiziert werden kann. Da es sich bei den untersuchten Proben um DNA aus *I. ricinus* Zecken aus Deutschland handelt, und somit keine Detektion von Theilerien zu erwarten ist, und *Rhipicephalus sanguineus* den wichtigsten Vektor für Hepatozoon darstellt (Eckert et al., 2005), wurde davon ausgegangen, dass die in dieser PCR ermittelten positiven Ergebnisse vorwiegend aus einer Amplifikation der 18Sr-DNA von *Babesia* spp. resultieren. Da *I. ricinus* vermutlich nur als Vektor der beiden *Babesia*-Spezies *B. divergens* und *B. microti* dient, ist zudem wahrscheinlich, dass es sich bei den hier nachgewiesenen Piroplasmen um einen oder beide der letztgenannten Erreger handelt.

5.4 Koinfektionen

Bei einem Zeckenstich sind neben Einzelinfektionen auch Mischinfektionen mit mehreren Erregern möglich. Levin und Fish (2000) konnten experimentell zeigen, dass die Übertragung des Erregers der Lyme Borreliose und der granulozytären Ehrlichiose unabhängig voneinander und mit gleicher Effektivität erfolgt. Koinfektionen konnten in Europa sowohl direkt aus Zecken (Baumgarten et al., 1999; Fingerle et al., 1999a; Leutenegger et al., 1999; Schouls et al. 1999; Derdákóvá et al. 2003; Hartelt et al. 2003) als auch indirekt durch die Detektion von Antikörpern (Hunfeld und Brade 1999; Oehme et al., 2002; Hermanowska-Szpakowicz et al., 2004) gegen mehrere durch Zecken übertragene Erreger nachgewiesen werden. In Süddeutschland konnten Baumgarten et al. (1999) in Zecken von Hunden und Rehen und Fingerle et al. (1999a) in Zecken von der Vegetation Koinfektionen von *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* sensu lato nachweisen. Fingerle et al. fanden diese Doppelinfektionen dabei ausschließlich in adulten Zecken aus einem Gebiet im Englischen Garten.

Auch in der vorliegenden Studie konnten Mischinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* und Piroplasmen in nüchternen und gesaugten Zecken nachgewiesen werden. Dabei war das Vorkommen von Doppelinfektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum*, wie in der Studie von Fingerle et al.,

(1999a) bei den nüchternen Zecken fast ausschließlich auf das Sammelgebiet im Englischen Garten begrenzt. Während *B. burgdorferi* sensu lato in allen Sammelgebieten ähnliche Prävalenzen zeigte, konnte in diesem Gebiet auch die höchste Prävalenz für *A. phagocytophilum* ermittelt werden. Das fokale Vorkommen von Koinfektionen ist in diesem Fall daher möglicherweise mit einer Anhäufung von *A. phagocytophilum* im Englischen Garten verknüpft.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Gebieten, die für Zecken übertragene Erreger wie *B. burgdorferi* sensu lato endemisch sind, bei einem Zeckenstich die Möglichkeit besteht, zusätzlich mit *A. phagocytophilum* und möglicherweise auch mit Piroplasmen wie *B. divergens* oder *B. microti* infiziert zu werden.

5.5 Schlussfolgerung, Ausblick

Beim Vergleich der Verteilung von *Borrelia* Spezies und der zugehörigen OspA-Typen in Zecken aus verschiedenen Sammelgebieten in München und Passau, ließ sich eine ausgeprägte Mikroheterogenität feststellen. Bei *A. phagocytophilum* sowie bei Koinfektionen dieses Erregers mit *B. burgdorferi* sensu lato fiel vor allem eine fokale Verbreitung mit vergleichsweise hohen Prävalenzen auf. Der Nachweis von Piroplasmen wies zudem auf eine mögliche Infektion der untersuchten nüchternen und gesaugten Zecken mit *B. divergens* und/oder *B. microti* hin.

Die großen Unterschiede in der Nachweishäufigkeit dieser Erreger zwischen gesaugten und nüchternen Zecken weisen darauf hin, dass andere Faktoren, wie möglicherweise Wirtstiere (siehe Kap. 2.3.2.1 und 2.3.2.4), einen Einfluß auf das Infektionsrisiko mit Zecken übertragenen Erregern haben könnten.

Die ermittelten Daten liefern einen wichtigen Beitrag zur Risikobewertung in den Untersuchungsgebieten, da die hohen Prävalenzen von *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* für *I. ricinus* Zecken ermittelt wurden, die aus von Mensch und Tier häufig besuchten Erholungsgebieten stammten. Aufgrund der geringen Probenzahl in den einzelnen Kategorien, abzulesen an den oft relativ großen Konfidenzintervallen, ließen sich jedoch keine lokalen Vorhersagen über potentielle Infektionsrisiken machen. Flächendeckende Studien mit einer größeren Anzahl von Zecken müßten über einen mehrjährigen Zeitraum durchgeführt werden, um Veränderungen der Zeckenpopulation

und der Durchseuchungsraten mit pathogenen Erregern über die Zeit feststellen zu können. Neben Prävalenzdaten im Vektor bedarf es aber auch an Daten zur Infektionshäufigkeit von potentiellen Wirten bzw. Reserviertieren mit diesen Erregern. Des Weiteren fehlen Daten zur Inzidenz, sowie umfangreiche seroepidemiologische Studien bei Mensch und Tier. Anhand dieser ganzen Daten könnte dann eine aussagekräftige Risikobewertung der entsprechenden Regionen erstellt werden.

Zuverlässige Daten zur Verteilung der verschiedenen Erreger in Vektor, Reserviertieren aber auch in klinischem Material, stellen zudem eine essentielle epidemiologische Basis für die Entwicklung von Bekämpfungsstrategien dar. So basiert die Entwicklung eines europäischen Impfstoffs gegen Lyme Borreliose auf Daten zur Heterogenität von *B. burgdorferi* sensu lato (Wilske et al., 1996a). Dafür bieten sich Vakzine auf der Basis von rekombinanten OspA und OspC an (Wilske et al., 1996b).

Kenntnisse über die Verbreitung der Spezies und Subtypen von Zecken übertragenen Erregern sind außerdem für die Etablierung und Evaluierung von epidemiologischen und diagnostischen Nachweisverfahren von großer Bedeutung. Wie die Detektion der neuen *Borrelia* Spezies A14S und des *B. garinii* Stamms IP90 in der vorliegenden Arbeit zeigen, sollte für die Entwicklung solcher PCR-Protokolle auch bisher als seltene beschriebene Erregerspezies- bzw. Subtypen berücksichtigt werden. Die in dieser Studie ermittelten Differenzen zwischen den in unterschiedlichen PCR-Methoden ermittelten Prävalenzen für *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* zeigen zudem deutlich welchen großen Einfluß die Spezifität und Sensitivität von Nachweisverfahren auf die Ergebnisse haben können.

6 Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg.

Vom Frühjahr 2003 bis zum Frühjahr 2004 wurden 625 adulte nüchterne *I. ricinus* Zecken aus drei Freizeit- und Erholungsgebieten im Raum München und Passau, 275 adulte gesaugte *I. ricinus* Zecken von Hunden aus Bayern und Baden-Württemberg und 25 adulte gesaugte *I. ricinus* Zecken von Weiderindern aus einem Endemiegebiet für bovine granulozytäre Ehrlichiose in der Schweiz gesammelt. Die Zecken wurden mittels Real-Time PCR und nested PCR auf eine Infektion mit *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* und Piroplasma untersucht. Die *B. burgdorferi* sensu lato-Spezies und -OspA-Typen wurden mittels RFLP-Analyse und Sequenzierung differenziert.

Die Untersuchung der nüchternen Zecken ergab für *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* und Piroplasma eine Prävalenz von 35,4%, 4,5% bzw. 1,3%. Dabei konnte für *B. burgdorferi* sensu lato kein signifikanter Unterschied zwischen den Sammelgebieten festgestellt werden, während beim Vergleich der Prävalenzen von *A. phagocytophilum* für ein Sammelgebiet in München ein hochsignifikant höherer und für ein Sammelgebiet bei Passau ein hochsignifikant niedriger Wert ermittelt werden konnte. Piroplasma waren vereinzelt in allen drei Sammelgebieten nachweisbar. Neben Einzelinfektionen konnten in 1,1% der nüchternen Zecken Koinfektionen mit *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum*, mit einer lokalen Anhäufung in einem Sammelgebiet in München, und in 0,3 % der nüchternen Zecken Koinfektionen von *B. burgdorferi* sensu lato und Piroplasma festgestellt werden.

In gesaugten Zecken von Hunden wurden für *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* und Piroplasma Prävalenzen von 8,4%, 4,7% bzw. 5,1% ermittelt. 0,7% der an Hunden gesaugten Zecken wiesen zudem eine Koinfektion von *B. burgdorferi* sensu lato und *A. phagocytophilum* auf.

Die Untersuchung der gesaugten Zecken von Rindern ergab eine Durchseuchungsrate von 8,0% für *B. burgdorferi* sensu lato und 60,0% für *A. phagocytophilum*, während keine

Infektion mit Piroplasmen nachgewiesen werden konnte. Die hohe Prävalenz für *A. phagocytophilum* resultiert dabei vermutlich aus einer Infektion der Weiderinder mit diesem Erreger.

Als Ursache für die unterschiedlichen Prävalenzen von *B. burgdorferi* sensu lato in nüchternen und gesaugten Zecken wurde deren unterschiedliche geographische Herkunft sowie ihr Blutaufnahme-Status, und die möglicherweise unterschiedlichen Wirtstierarten vermutet.

Die Differenzierung von *B. burgdorferi* sensu lato in die zugehörigen Spezies und OspA-Typen ergab den Nachweis der in Europa klinisch relevanten Spezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. garinii*, wobei *B. garinii* durch die OspA-Typen 3, 4, 5, 6 und 8 repräsentiert war. Des Weiteren wurde *B. valaisiana*, eine Spezies für die eine Humanpathogenität vermutet wird, und die erst kürzlich beschriebene neue *Borrelia*-Genospezies A14S detektiert. Insgesamt konnte bei nüchternen Zecken, vor allem aus einem Sammelgebiet im Raum München, eine große Heterogenität sowohl hinsichtlich der gefundenen *Borrelia*-Spezies, als auch der OspA-Typen beobachtet werden. Gesaugte Zecken von Hunden und Rindern wiesen dagegen ein weniger heterogenes Verteilungsmuster auf.

6.2 Summary

Studies on the prevalences of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spp., *Anaplasma phagocytophilum* and piroplasms in *Ixodes ricinus* from Bavaria and Baden-Württemberg

625 adult unfed *I. ricinus* ticks from three recreational areas located near Munich and Passau, 275 adult engorged *I. ricinus* ticks from dogs of Bavaria and Baden-Württemberg and 25 adult engorged *I. ricinus* ticks from cattle of an area in Switzerland, which is endemic for bovine granulocytic ehrlichiosis, were collected over a specific period (3/2003 – 3/2004). The ticks were examined for an infection with *B. burgdorferi* sensu lato spp., *A. phagocytophilum* and piroplasms by the use of Real-Time PCR and nested PCR. In addition RFLP analysis and sequencing were chosen for the differentiation of the species and OspA types of *B. burgdorferi* sensu lato.

The examination of unfed ticks resulted in a prevalence of 35,4% for *B. burgdorferi* sensu lato, 4,5% for *A. phagocytophilum* and 1,3% for piroplasms. There was no significant difference for the infection rates of *B. burgdorferi* sensu lato between the different sampling areas, whereas *A. phagocytophilum* showed a significantly higher prevalence in one sampling site in Munich and a significantly lower prevalence in Passau. Apart from infections with only one pathogen, coinfections with *B. burgdorferi* sensu lato and *A. phagocytophilum* could be detected in 1,1% of the unfed ticks, with a local cluster in one area in Munich and 0,3% of the unfed ticks showed a coinfection with *B. burgdorferi* sensu lato and piroplasms.

Prevalence rates of 8,4%, 4,7% and 5,1%, were identified for *B. burgdorferi* sensu lato, *A. phagocytophilum* and piroplasms respectively in engorged ticks from dogs, 0,7% of these ticks were coinfecting with *B. burgdorferi* sensu lato and *A. phagocytophilum*.

The examination of engorged ticks from cattle revealed in a prevalence rate of 8,0% for *B. burgdorferi* sensu lato and 60,0% for *A. phagocytophilum*. The high infection rate of *A. phagocytophilum* probably resulted from an infection of the cattle with this pathogen.

The difference in the prevalence rates of *B. burgdorferi* sensu lato in unfed and engorged ticks might be caused by their distinct geographical origin, the degree of blood uptake and different factors in the blood of the different host species which are able to protect the host from being infected with *Borrelia*.

The differentiation of *B. burgdorferi* sensu lato into the species and OspA types showed that the clinically relevant species *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto and *B. garinii*, in which *B. garinii* was represented by the OspA types 3, 4, 5, 6 and 8 could be detected. Additionally, *B. valaisiana*, a species which is suspected of being pathogenic to humans and a recently described new *Borrelia* genospecies, A14S, were detected. Altogether a broad heterogeneity for *Borrelia* species and subspecies (classified by OspA types) could be observed in unfed ticks, above all in one sampling site in Munich. Ticks engorged from dogs and cattle showed a less heterogeneous pattern of distribution.

7 Literaturverzeichnis

Adelson ME, Rao RVS, Tilton RC, Cabets K, Eskow E, Fein L, Occi JL, Mordechai E. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in Northern New Jersey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2799-2801

Afzelius A. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 16 Dezember 1910 Dermatol Syph (Berlin) 1910; 101: 405-6

Anderson JF. Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. J Inf Dis 1989; 2: 1451-6

Anderson JF. Mammalian and avian reservoirs for *Borrelia burgdorferi*. Ann N Y Acad Sci 1988; 539: 180-8

Asbrink E, Hovmark A, Weber K. Acrodermatitis chronica atrophicans In: Weber K, Burgdorfer W(eds). Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1993; 193-204

Babès V. Sur hemoglobinurie bacterienne du bœuf. Comt Rend Acad Sci 1888; 107: 692-4

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States A new species emerging? JAMA 1994; 272: 212-7

Balmelli T, Piffaretti JC. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res Microbiol 1995; 146: 329-40

Bannwarth A. Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und 'Rheumatismus'. Arch Psychiatr Nervenkr 1941; 113: 284-76

Baranton G, Postic D, Saint-Giron I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp nov, and group VS461 associated with Lyme borreliosis. Int J Syst Bacteriol 1992; 42: 378-83

Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. Microbiol Rev 50: 1986; 381-400

- Baumgarten BU, Röllinghoff M, Bogdan C. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from Southern Germany. J Clin Microbiol 1999; 37:3348-51
- Beichel E, Petney TN, Hassler D, Brückner M, Maiwald M. Tick infestation patterns and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks. Collected at a veterinary clinic in Germany Vet Parasitol 1996; 65: 147-55
- Benson MJ, Gawronski JD, Eveleigh DE, Benson DR. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*). From Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts Appl Environ Microbiol 2004; 70: 616-20
- Bergstrom S, Bundoc VG, Barbour AG. Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 1989; 3: 479-86
- Brandt F, Healy GR, Welch M. Human babesiosis: the isolation of *Babesia microti* in golden hamsters. J Parasitol 1977; 63: 934-7
- Buchwald A. Ein Fall diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. Dermatol Vierteljahresschr 1883; 10: 553-6
- Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. Yale J Biol Med 1984; 57: 515-20
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease-a tick-borne spirochaetosis? Sci 1982; 216: 1317-9
- Burgess EC. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. Ann N Y Acad Sci 1988; 539: 235-43
- Busch U, Hizo-Teufel C, Bohmer R, Fingerle V, Rossler D, Wilske B, Preac-Mursic V. *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from cutaneous Lyme borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. Scand J Infect Dis 1996; 28: 583-9
- Büscher G, Gandras R, Apel G, Friedhoff KT. Der erste Fall von Ehrlichiose beim Pferd in Deutschland (Kurzmitteilung). Dtsch Tierärztl Wschr 1984; 91: 408-9
- Callister SM, Jobe DA, Schell RF, Lovrich SD, Onheiber KL, Korshus JB. Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. J Clin Microbiol 2000; 38: 3670-4

Camacho AT, Pallas E, Gestal JJ, Guitian FJ, Olmeda AS, Telford III SR, Spielman A. *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Vet Parasitol* 2003; 112: 157-63

Cao WC, Zhao QM, Zhang PH, Yang H, Wu XM, Wen BH, Zhang XT, Habbema JDF. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes persulcatus* ticks from northeastern China. *Am Trop Med Hyg* 2003; 68: 547-50

Casati S, Bernasconi MV, Gern L, Piffaretti JC. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. *FEMS Microbiology Letters* 2004; 238: 115-23

Centeno-Lima S, do Rosário V, Parreira R, Maia AJ, Freudenthal AM, Nijhof AM, Jongejan F. A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 760-4

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 589-95

Christova I, Schouls L, van de Pol I, Park J, Panayotov S, Lefterova V, Kantardjiev T, Dumler JS. High Prevalence of Granulocytic Ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Ticks from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4172-4

Cinco M, Padovan D, Murgia R, Poldini L, Frusteri L, van Dam PI, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema S, Maroli M. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 90-4

Conrad PA, Thomford JW, Marsh A, Telford SR, Anderson JF, Spielman A, Sabin EA, Yamane I, Persing DH. Ribosomal DNA probe for differentiation of *Babesia microti* and *Babesia gibsoni* isolates. *J Clin Microbiol* 1992; 5: 1210-5

Courtney JW, Kostelnik LM, Nordin SZ, Massung RF. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3164-8

da Silva Vaz Jr I, Imamura S, Nakajima C, Cardoso de Cardoso F, Sanchez Ferreira CA, Renard G, Masuda A, Ohashi K, Onuma M. Molecular cloning and sequence analysis of

- cDNAs encoding for *Boophilus microphilus*, *Haemaphysalis longicornis* and *Rhipicephalus appendiculatus* actins. *Vet Parasitol* 2005; 127: 147-55
- De Silva AM, Fikrig E. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 397-404
- Derdáková M, Dudíáák V, Brei B, Brownstein JS, Schwartz I, Fish D. Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6783-8
- Devos J, Geysen D. Epidemiological study of the prevalence of *Babesia divergens* in a veterinary practice in the mid-east of France. *Vet Parasitol* 2004; 125: 237-49
- Donatien A und Lestoquard F. Existence en Algérie d'une rickettsia du chien *Bull. Soc Pathol Exot* 1935; 28: 418-19
- Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Diversity of *Babesia* infecting European sheep tick (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3395-7
- Duh D, Petrovec M, Trilar T, Avsic-Zupanc T. The molecular evidence of *Babesia microti* infection in small mammals collected in Slovenia. *Parasitol* 2003; 126: 113-7
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of the genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst, Evol Microbiol* 2001; 51: 2145-65
- Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgart GmbH & Co 2005; 97-107, 349-60
- Eiffert H, Ohlenbusch A, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Matuschka FR. Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 1995; 171: 476-9
- Etkind P, Piesman J, Ruebush II T, Spielman A, Juranek DD. Methods for detecting *Babesia microti* infection in wild rodents. *J Parasitol* 1980; 66: 107-10

- Fenollar F, Maurin M, Raoult D. *Wolbachia pipientis* growth kinetics and susceptibilities to 13 antibiotics determined by immunofluorescence staining and Real-Time. PCR Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2003; 47: 1665-71
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. Sci 1990; 250: 553-6
- Fingerle V, Bergmeister H, Liegl G, Vanek E, Wilske B. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. J Spiroch Tick Dis 1994; 1: 41-5
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh U, Wilske B.. Epidemiological aspects of human granulocytic Ehrlichiosis in Southern Germany. Wien Klin Wochenschr 1999b; 111: 1000-4
- Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh U, Wilske B. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. J Clin Microbiol 1997; 35: 3244-7
- Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1867-9
- Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. Med Microbiol Immunol (Berl) 2000; 189: 59-66
- Fingerle V, Liegl G, Munderloh U, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. Med Microbiol Immunol (Berl) 1998;187: 121-6
- Fingerle V, Liegl G, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C in engorged *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. Gubler, D J and Lane, R S 76 VII International Congress on Lyme Borreliosis, San Francisco, California 1996
- Fingerle V, Michel H, Hettche G, Hizo-Teufel C, Wilske B. *Borrelia burgdorferi* s l OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. Int J Med Microbiol 293, Suppl 2003; 37: 165-6

- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. Coexistence of *ehrlichiae* of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1999a; 188: 145-9
- Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1456-63
- Fraenkel CJ, Garpmo U, Berglund J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3308-12
- Franca C. Sur la classification des Piroplasmes et description de deux formes de ces parasites. *Arch Inst Bact C Pestana* 1912; 3: 11-8
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 1997; 390: 580-6
- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. *Borrelia tanukii* sp nov and *Borrelia turdae* sp nov found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* 1996; 40: 877-81
- Gall Y und Pfister K. Fragen zur Lyme-Borreliose beim Pferd. *Prakt Tierarzt* 2004; 85: 654-6
- Gerhards H, Offeney F, Friedhoff KT. Ehrlichia-Infektion beim Pferd. *Pferdeheilk* 1987; 3: 283-91
- Gerhards H, Wolanke B. Antikörper gegen Borrelien bei Pferden im Serum und im Auge und Vorkommen der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). *Berl Münch Tierärztl Wschr* 1996; 109: 273-8
- Gern L, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Krampitz HE. The ecology of Lyme borreliosis in Europe. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1993; 59-69

- Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TGT, Jøgejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA. Review: European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zbl Bacteriol 1998; 287: 196-204
- Goodman JL, Nelson C, Vitale B, Madigan JE, Dumler JS, Kurtti TJ, Munderloh UG. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med 1996; 334: 209-15
- Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. J Clin Microbiol 2001; 39: 844-8
- Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schetters TP. Human babesiosis. Ann Trop Med Parasitol 1998; 92: 489-501
- Gorenflot A, Piette M, Marchand A. Babésioses connect et santé humaine. Premier cas de babésiose humaine observé en France. Rec Med Vet 1976; 152: 289-97
- Gray JS. Review: The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. Exp Appl Acarol 1998; 22: 249-58
- Gray JS, Harte LN. An estimation of the prevalences and economic importance of clinical bovine babesiosis in the Republic of Ireland. Ir Vet J 1985; 39: 75-8
- Gray JS, Kahl O, Janetzki C, Stein J. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. J Med Entomol 1992; 29: 915-20
- Gray J, von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Granström M. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and Gerbils. J Clin Microbiol 2004; 40: 1259-63
- Greig B, Asanovich KM, Armstrong PJ, Dumler JS. Geographic, clinical, serologic and molecular evidence of granulocytic ehrlichiosis, a likely zoonotic disease, in Minnesota and Wisconsin dogs. J Clin Microbiol 1996; 34: 44-8
- Gribble DH. Equine Ehrlichiosis. J Am Vet Med Assoc 1969; 155: 462-9
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp. , *Rickettsia* sp. , and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int J Med Microbiol 293, Suppl 2003; 37: 86-92
- Hellerström S. Erythema chronicum migrans Afzelii. Acta Derm Venerol 1930; 11: 315-21

- Heo EJ, Park JH, Koo JR, Park MS, Park MY, Dumler JS, Chae JS. Serologic and molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* (human granulocytic Ehrlichiosis agent) in Korean patients. J Clin Microbiol , 2002; 40: 3082-5
- Hermanowska-Szpakowicz T, Skotarczak B, Kondrusik M, Rymaszewska A, Sawczuk M, Maciejewska A, Adamska M, Pancewicz S, Zajkowska J. Detecting DNA's of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. Ann Agric Environ Med 2004; 11: 351-4
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E. Prevalence of granulocytic *Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment FEMS. Microbiol Lett 2002; 211: 225-30
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in Central Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 364-7
- Hillyard PD. Ticks of North-West Europe. The Dorset Press, Dorchester, Great Britain 1996
- Hinaidy HK. Die Babesiose des Rindes in Österreich. Zbl Vet Med B 1981; 28: 146-60
- Hoffman-Lehmann R, Meli ML, Dreher UM, Gönczi E, Deplazes P, Braun U, Engels M, Schüpbach J, Jörgler K, Thoma R, Griot C, Stärk KDC, Willi B, Schmidt J, Kocan KM, Lutz H. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. J Clin Microbiol 2004; 42: 3775-80
- Holst A. Der Hund als Indikator für das Infektionsrisiko des Menschen an Lyme-Borreliose: Eine seroepidemiologische Untersuchung zur Lyme-Borreliose des Hundes insbesondere in Niedersachsen. Dissertation Tierärztl. Hochschule Hannover 1996
- Holst A, Liebisch A, Lehmacher W, Käsbohrer A, Nolte J. Die Lyme-Borreliose des Hundes, Vorkommen und Epidemiologie. Proceed. 22. Kongreß der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft Bad Nauheim 1997
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 451-69

- Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J Clin Microbiol 2001; 39: 1169-71
- Hubálek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur J Epidemiol 1997; 13: 951-7
- Hubálek Z, Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasitol Res 1998; 84: 167-72
- Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z. *Borreliae* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. Med Vet Entomol 2004; 28: 228-231
- Humair PF, Rais O, Gern L. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. Parasitol 1998; 118: 33-42
- Hunfeld KP, Brade V. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 221-4
- Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in Midwestern Germany. J Clin Microbiol 2002; 40: 2431-6
- Hunfeld KP, Oschmann P, Kaiser R, Schulze J, Brade V. Diagnostik: Lyme-Borreliose. Bremen: UNI-MED 1998; 81-108
- Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18: 697-703
- Hussein SH. *Ixodes trianguliceps*: seasonal abundance and role in the epidemiology of *Babesia microti* infection in north-western England. Ann Trop Med Parasit 1980; 74: 531-9
- Johansson KE, Pettersson B, Uhlén M, Gunnarsson A, Malmqvist M, Olsson E. Identification of the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses by direct solid phase sequencing of PCR products from the 16 rRNA gene. Res Vet Science 1995; 58: 109-12

- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 1984; 34: 438-97
- Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marjamäki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1361-5
- Kálmán D, Sréter T, Szell Z, Egyed L. *Babesia microti* infection of anthropophilic ticks (*Ixodes ricinus*) in Hungary. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 317-9
- Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zbl Bacteriol* 1998; 287: 41-52
- Kampen H, Rötzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM. Substantial rise in the prevalence of Lyme Borreliosis spirochetes in a region of Western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1576-82
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 843-8
- Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 67-72
- Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1323-37
- Klaschnik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Gebel J, Hoefft A, Stuber F. Detection and Differentiation of in vitro-spiked bacteria by Real-Time PCR and melting-curve analysis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 512-7
- Kordick SK, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Southwick KL, Colitz CM, Hancock SI, Bradley JM, Rumbough R, McPherson JT, MacCormack JN. Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a walker hound kennel in North Carolina. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2631-8
- Krampitz HE. *Babesia microti*: Morphology, distribution and host relationship in Germany. *Zbl Bakt Hyg , I Abt Orig A* 1979; 244: 411-5

- Krampitz HE, Bäuml W. Vorkommen, Saisondynamik und Wirtskreis von *Babesia microti* (Franca, 1912) in einheimischen Nagetieren. Z Parasitenkd 1978; 58: 15-33
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 1169-74
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp nov by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 1997; 47: 921-5
- Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J Clin Microbiol 1999; 37: 3390-1
- Lewis D und Young ER. The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks. J Parasitol 1980; 66: 359-60
- Liebisch A, Liebisch G. Zeckenborreliose Lyme-Krankheit beim Tier. H Horst, 4. überarbeitete Auflage Spitta Verlag GmbH u Co KG 2003; 6-70
- Liebisch G, Liebisch A. Zur Diagnose wenig bekannter einheimischer durch Zecken übertragener Infektionen bei Hunden in Deutschland. Prakt Tierarzt 1999; 80: 474-82
- Liebisch G, Sohns B, Bautsch W. Detection and Typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36: 3355-8
- Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 1995; 33: 589-95
- Liz JS. *Ehrlichia phagocytophila*: aspects épidémiologiques, hématologiques et sérologiques de l'infection chez les bovines en Suisse. PhD thesis University of Neuchâtel, Neuchâtel, Schweiz 1994
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. PCR Detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in Western Switzerland. J Clin Microbiol 2000; 38: 1002-7

- Liz JS, Sumner JW, Pfister K, Brossard M. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). J Clin Microbiol 2002; 40: 892-7
- M'Fadyean J, Stockman S. A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. J Comp Pathol 1911; 24:340-54
- Madigan J, Gribble D. Equine Ehrlichiosis in Northern California: 49 Cases (1968-1981). J Am Vet Med Assoc 1987; 190: 445-8
- Madigan JE, Barlough JE, Dumler JS, Schankman NS, deRock E. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic Ehrlichia. J Clin Microbiol 1996; 34: 434-5
- Madigan JE, Richter Jr PJ, Kimsey RB, Barlough JE, Bakken JS, Dumler JS. Transmission and passage in horses of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Inf Diseases 1995; 172: 1141-4
- Magnarelli LA, Anderson JF, Levine HR. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. J Am Vet Med Assoc 1990; 197: 63-6
- Magnarelli LA, Ijdo JW, Anderson JF, Padula SJ, Flavell RA, Fikrig E. Human exposure to a granulocytic *Ehrlichia* and other tick-borne agents in Connecticut. J Clin Microbiol 1998; 36: 2823-7
- Magnarelli LA, Stafford III KC, Mather TN, Yeh MI, Horn KD, Dumler JS. Hemocytic rickettsia-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to *Ehrlichiae* and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2710-14
- Manna L, Alberti A, Pavone LM, Scibelli A, Staiano N, Gravino AE. Vet. J 2004; 167: 224-7
- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp nov and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp nov) isolates. J Clin Microbiol 1995; 33: 2427-34
- Marcus LC, Steere AC, Duray PH, Anderson AE, Mahoney EB. Fatal pancarditis in a patient with coexistent Lyme disease and Babesiosis. Ann Intern Med 1985; 103:374-6

- Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol 2003; 41: 717-22
- Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J Clin Microbiol 1998; 36: 1090-5
- Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp nov, a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51: 1817-24
- Matuschka FR, Heiler M, Eiffert H, Fischer P, Lotter H, Spielman A. Diversionary role of hoofed game in the transmission of Lyme disease spirochetes. Am J Trop Med Hyg 1993; 48: 639-99
- Michel H, Wilske B, Hettche G, Göttner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V. 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 Immunol (Berl) 2003; 193:219-26
- Mitchell PD, Reed KD, Hofkes JM. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. J Clin Microbiol 1996; 34: 724-7
- Moore JA, Kuntz RE. *Babesia microti* infections in nonhuman primates. J Parasitol 1981; 67: 454-6
- Munderloh UG, Jauron SD, Fingerle V, Leitritz L, Hayes SF, Hautman JM, Nelson CM, Huberty BW, Kurtti TJ, Ahlstrand GG, Greig B, Mellencamp MA, Goodman JL. Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. J Clin Microbiol 1999; 37: 2518-24
- Munderloh UG, Madigan JE, Dumler JS, Goodman JL, Hayes SF, Barlough JE, Nelson CM, Kurtti TJ. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. J Clin Microbiol 1996; 34: 664-70
- Munderloh UG, Tate CM, Lynch MJ, Howerth EW, Kurtti TJ, Davidson WR. Isolation of an *Anaplasma* sp organism from white-tailed deer by tick cell culture. J Clin Microbiol 2003; 41: 4328-35

- Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 3926-32
- Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 2002; 33: 22-9
- Ogden NH, Brown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennet M. Granulocytic ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the A. K *Med Vet Entomol* 1998; 12: 423-9
- Ogden NH, Casey ANJ, Woldehiwet Z, French NP. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Inf Immun* 2003; 71: 2071-2078
- Oliveira MR, Kreier JP. Transmission of *Babesia microti* using various species of ticks as vectors. *J Parasit* 1979; 65: 816-7
- Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61: 3082-7
- Olsen B, Jaenson TG, Noppa L, Bunikis J, Bergstrom S. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* 1993; 362: 340-2
- Olsson Engvall E, Egenvall A. Granulocytic ehrlichiosis in Swedish dogs and horses. *Int J Med Microbiol* , 291, Suppl 33 2002;100-3
- Olsson Engvall E, Pettersson B, Persson M, Artursson K, Johansson KE. A 16Sr-RNA-based PCR assay for detection and identification of granulocytic *Ehrlichia* species in dogs, horses and cattle. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2170-4
- Oporto B, Gil H, Barral M, Hurtado A, Juste RA, Garcia-Perez AL. A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 98-102
- Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, Schafer C, Wellensiek HJ, Pflughaupt KW. Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol* 1998; 245: 262-72
- Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *J Clin Inv* 2004; 113: 220-30

- Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat ticks and tickborne diseases. *CID* 2001; 32: 897-928
- Paul H, Gerth HJ, Ackermann R. Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Hyg* 1986; 263: 473-6
- Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford SR, Spielman A, Thomford JW und Conrad PA. Detection of *Babesia microti* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2097-2103
- Petrovec M, Lotric Furlan S, Avsic Zupanc T, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler S. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 1997; 1556-9
- Petrovec M, Sixl W, Schweiger R, Mikulasek S, Elke L, Wust G, Marth E, Strasek K, Stunzner D, Avsic-Zupanc T. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republik. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 990: 103-6
- Pfister HW, Kristoferitsch W, Meire C. Early neurological involvement (Bannwarth's Syndrome) In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1993; 152-67
- Pfister K, Roesti A, Boss PH, Balsiger B. *Ehrlichia phagocytophila* als Erreger des „Weidefiebers“ in dem Berner Oberland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1987; 129: 343-7
- Picken RN, Cheng Y, Strle F, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljić E, Han D, Nelson JA, Picken MM, Trenholme GM. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Slovenia revealing significant differences between tick and human isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 313-23
- Piesman J, Maupin GO, Campos EG, Happ CM. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J Infect Dis* 1991; 163: 895-7
- Pietilä J, He Q, Oksi J, Viljanen MK. Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by LightCycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the *recA* gene. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2756-9

- Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. J Clin Microbiol 2004; 42: 2285-6
- Postic D, Korenberg E, Gorelova N, Kovalevski YV, Bellenger E, Baranton G. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. Res Microbiol 1997; 148: 691-702
- Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G. Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp nov (formerly *Borrelia* group DN127). J Clin Microbiol 1998; 36: 3497-3504
- Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. Infection 1989; 17: 355-9
- Purnell RE. Tick-borne diseases of British livestock. Vet Med Rev 1981; 1: 58-69
- Purnell RE, Brocklesby DW, Stark AJ, Young ER. Reactions of splenectomised calves to the inoculation of blood containing *Babesia divergens* from an infected animal during its reaction and carrier phases. J Comp Pathol 1978; 88: 419-23
- Pusterla N, Berger Pusterla J, Braun U, Lutz H. Serological, hematologic, and PCR studies of cattle in an area of Switzerland in which tick-borne fever (caused by *Ehrlichia phagocytophila*) is endemic. Clinical and Diagnostic Immunology 1998a; 5: 325-7
- Pusterla N, Berger Pusterla J, Deplazes P, Wolfensberger C, Müller W, Hörauf A, Reusch C, Lutz H. Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and canine granulocytic *Ehrlichia* infection in dogs in Switzerland. J Clin Microbiol 1998c; 36: 3460-2
- Pusterla N, Huder JB, Leutenegger CM, Braun U, Madigan JE, Lutz H. Quantitative Real-Time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999; 37: 1329-31
- Pusterla N, Huder JB, Lutz H, Braun U. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* Ticks from Areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. J Clin Microbiol 1998b; 36: 2735-6
- Pusterla N, Wolfensberger C, Lutz H, Braun U. Serologische Untersuchungen über das Vorkommen der bovinen Ehrlichiose in den Kantonen Zürich, Schaffhausen, Thurgau, St Gallen und Obwalden. Schweiz Arch Tierheilkd 1997; 139: 543-9

- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, Real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 36-43
- Reimer B, Marschang A, Fingerle V, Wilske B, Sonnenburg FV, Hoecke C. Epidemiology of Lyme borreliosis in south-eastern Bavaria (Germany). *Zbl Bakteriol* 1999; 289: 653-4
- Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Ann Rev Entomol* 1987; 32: 463-78
- Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A. Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med* 1985; 161: 332-44
- Richter D, Klug B, Spielman A, Matuschka FR. Adaption of diverse spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Inf Immun* 2004a; 72: 2442-4
- Richter D, Schlee DB, Allgöwer R, Matuschka FR. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp nov , with its hosts in central Europe. *Appl Environ Microbiol* 2004b; 70: 6414-9
- Rijpkema S, Golubic D, Molkenboer M, Verbeek-de Kruif N, Schellekens J. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol* 1996a; 20: 23-30
- Rijpkema SG, Herbes RG, Verbeek-de Kruif N, Schellekens JF. Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Netherlands. *Epidemiol Infect* 1996b; 117: 563-6
- Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 109-16
- Rikihisa Y. The tribe Ehrlichieae and Ehrlichial diseases. *Clin Microbiol Rev* 4 1991; 286-308
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T. Veterinärmedizinische Parasitologie: Begründet von Josef Boch und Rudolf Supperer Parey. Buchverlag Berlin, 5 , vollständig neu bearbeitete Auflage 173-181, 2000; 297-301

- Rosa PA, Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 1989; 160: 1018-29
- Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 185-201
- Schönert S, Grabner A, Heidrich J, Schönberg A, Nöckler K, Bahn P, Luge E, Brem S, Müller W. Lyme-Borreliose beim Pferd? – Vergleichende Betrachtungen zum direkten und indirekten Erregernachweis. Prakt Tierarzt 2002; 83: 12, 1064-68
- Schouls LM, Van de Pol I, Rijpkema SGT, Schot CS. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999; 37: 2215-22
- Schwaiger M, Péter O, Cassinotti P. Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 461-9
- Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. J Clin Microbiol 2000; 38: 382-8
- Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. Am J Trop Med Hyg 1997; 56: 339-42
- Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske V, Kurtti TJ, Munderloh UG. *Rickettsia monacensis* sp nov , a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a european city park. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 4559-66
- Sixl W, Petrovec M, Marth E, Wüst G, Stünzer D, Schweiger R, Avsic-Zupanc T. Investigation of *Anaplasma phagocytophila* Infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 94-7
- Skotarczak B. Canine borreliosis – epidemiology and diagnostics. Ann Agric Environ Med 2002; 9: 137-40
- Skotarczak B. Canine ehrlichiosis. Ann Agric Environ Med 2003;10: 137-41
- Skotarczak B, Cichocka A. Isolation and amplification by Polymerase Chain Reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. Ann Agric Environ Med 2001; 8: 187-9

- Sonenshine DE. Biology of ticks Vol 1. Oxford University Press, New York 1991
- Sonenshine DE. Biology of ticks Vol 2. Oxford University Press, New York 1993
- Sparagano OAE , Allsopp MTEP, Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa, JV, Jongejan, F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: *Ixodidae*): A review. Exp Appl Acarol 1999; 23: 929-60
- Spielman A, Clifford CM, Piesman J, Corwin MD. Human babesiosis on Nantucket Island, USA: description of the vector, *Ixodes (Ixodes) dammini*, n sp (Acarina: *Ixodidae*). J Med Entomol 1979; 15: 218-34
- Sréter T, Sréter-Lancz Z., Széll Z., Kálmán D. *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and Central Eastern Europe. Ann Trop Med Parasitol 2004; 98: 401-5
- Steere AC. Lyme disease. N Engl J Med 1989; 321: 586-96
- Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum Ann Intern Med 1977a; 86: 685-98
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Andiman WA. A cluster of arthritis in children and adults in Lyme. Connecticut Arthritis Rheum 1976; 19: 824
- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis Rheum 1977b; 20: 7-17
- Straubinger RK. PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. J Clin Microbiol 2000; 38: 2191-9
- Stryer L. Biochemie, 4. Auflage. Aus dem Englischen übersetzt von Stoll G, Pfeiffer B und J. Guglielmi Spektrum Akademischer Verlag, 1996; 127-8
- Stuen S, Van de Pol I, Bergström K, Schouls LM. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. J Clin Microbiol 2002; 40: 3192-7
- Süss J, Schrader C. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil I: Zecken und Viren. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz Springer-Verlag, 2004; 47, 392-404

Telford III SR, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A. Babesial infections in humans and wildlife. 1-45 In Kreier JP (ed), Parasitic protozoa Academic Press, San Diego, Calif 1993

Tozon N, Petrovec M, Avšič-Županc T. Clinical and laboratory features of the first detected cases of *A phagocytophila* infections in dogs from Slovenia. Ann N Y Acad Sci 2003; 990: 424-8

Uilenberg G, Thiaucourt F, Jongejan F. On molecular taxonomy: what is in a name? Exp Appl Acarol 2004; 32: 301-12

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

Van der Linde MR, Ballmer PE. Lyme carditis In: Weber K, Burgdorfer W (eds) Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1993; 131-51

Venner M und Deegen E. Interpretation von *Borrelia burgdorferi* Antikörpertitern beim Pferd unter Berücksichtigung der Kenntnisse zur Borreliose beim Menschen – eine Literaturübersicht. Pferdeheilkunde 1996; 12: 865-73

Von Loewenich FD, Stumpf G, Baumgarten BU, Rollinghoff M, Dumler JS, Bogdan CA. case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* (HGE agent) in Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003a; 22: 303-5

Von Loewenich FD, Stumpf G, Baumgarten B, Röllinghoff M, Dumler JS, Bogdan C. Human granulocytic ehrlichiosis in Germany. Evidence from serological studies, tick analyses, and a case of equine ehrlichiosis. Ann N Y Acad Sci 2003b; 990: 116-7

Von Stedingk LV, Gürtelschmid M, Hanson HS, Gustafson R, Dotevall L, Olsson Engvall E, Granström M. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. Clin Microbiol Infect 1997; 3: 573-4

Walls JJ, Greig B, Neitzel DF, Dumler JS. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Microbiol 1997; 35: 853-5

Walter G. Isolierung von *Babesia microti* (Franca 1912) aus freilebenden Nymphen von *Ixodes ricinus* (Linnaeus 1758). Acta Tropica 1981; 38: 187-8

- Walter G, Liebisch A. Untersuchungen zur Ökologie einiger Blutprotozoen bei wildlebenden Kleinsäugetern in Norddeutschland. *Acta Tropica* 1980; 37: 31-40
- Walter G, Weber G. Untersuchungen zur Übertragung (transstadial, transovarial) von *Babesia microti*, Stamm „Hannover I“, in *Ixodes ricinus*. *Tropenmed Parasit* 1981; 32: 228-30
- Wang G, Liveris D, Brei B, Wu H, Falco RC, Fish D, Schwartz I. Real-Time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 4561-5
- Wang G, van Dam AP, Dankert J. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1999a; 37: 3025-8
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47: 926-32
- Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999b; 12: 633-53
- Wang G, van Dam AP, Spanjaard L, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 768-76
- Weber K, Schierz G, Wilske B, Preac-Mursic V. Lymphocytoma-a borreliosis? *Z Hautkr* 1985; 60: 1585-98
- Weber R, Pusterla N, Loy M, Leutenegger CM, Schär G, Baumann D, Wolfensberger C, Lutz H. Serologische und klinische Daten weisen auf das endemische Vorkommen der humanen granulocytären Ehrlichiose in der Nordschweiz hin. *Schweiz Med Wochenschr* 2000; 130: 1462-70
- Will G, Jauris-Heipke S, Schwab E, Busch U, Rössler D, Soutschek E, Wilske B, Preac-Mursic V. Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 184: 73-80

- Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis* 1995; 2003; 3:215-27
- Wilske B. Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 2002; 33: 114-19
- Wilske B, Barbour AG, Bergstrom S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp.. *Res Microbiol* 1992; 143: 583-96
- Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rossler D, Preac-Mursic V. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol (Berlin)* 1996a; 184: 195-201
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac-Mursic V, Rossler D, Will G. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 1996b; 24: 208-12
- Wilske B, Fingerle V. Ehrlichiose: Eine neue zeckenübertragene Infektionskrankheit. *Münch Med Wschr* 1996c; 138: 202-4
- Wilske B, Fingerle V. Neue durch Zecken übertragene Infektionskrankheit: die humane granulozytäre Ehrlichiose. *mta Spektrum* 2000; 7: 377-80
- Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 340-50
- Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1942-6
- Wittenbrink MM, Thiele D, Krause H. Comparison of darkfield microscopy, culture and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks. *Zbl Bakteriol* 1994; 281: 183-91
- Zahler M, Rinder H, Gothe R. Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasmids. *Parasitol Res* 2000a; 86: 642-646
- Zahler M, Rinder H, Schein E, Gothe R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol* 2000b; 89: 241-8

Zahler M, Rinder H, Zwegarth E, Fukata T, Maede Y, Schein E, Gothe R. '*Babesia gibsoni*' of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitol* 2000c; 120: 365-69

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *J Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 622-36

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Bp	Basenpaare
DabcyI	Dimethylaminophenylbenzoesäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dest.	destilliert
dCTP	2'-Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (=DNS)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluoreszein
<i>fla</i>	Flagellin
H ₂ O	Wasser
Hex	Hexachlorfluoreszein
ITPG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K ₂ HPO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	millimolar
<i>msp2</i>	membraneous surface protein 2
NaAc	Natrium-Acetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhypochlorid

ng	Nanogramm
nM	nanomolar
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
OspA	Outer surface protein A (Oberflächenprotein A)
pM	pikomolar
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Tabelle Prävalenzen

B. burgdorferi sensu lato, *A. phagocytophilum* und Piroplasmen in nüchternen Zecken und gesaugten Zecken von Hunden und Rindern

<i>B. burgdorferi</i> sensu lato	Gesamtzahl	positiv		95% Kofidenzintervall
		n	%	
nüchterne Zecken	625	221	35,4	31,7-39,2
gesaugte Zecken Hund	275	23	8,4	5,1-11,6
gesaugte Zecken Rind	25	2	8	0-20

<i>A. phagocytophilum</i>	Gesamtzahl	positiv		95% Kofidenzintervall
		n	%	
nüchterne Zecken	625	28	4,5	2,9-6,2
gesaugte Zecken Hund	275	13	4,7	2,6-7,3
gesaugte Zecken Rind	25	15	60	40-80

Piroplasmen	Gesamtzahl	positiv		95% Kofidenzintervall
		n	%	
nüchterne Zecken	625	8	1,3	0,5-2,2
gesaugte Zecken Hund	275	14	5,1	2,6-8
gesaugte Zecken Rind	25	-	-	-

Lebenslauf

Persönliche Daten	Sarah Leonhard Geboren am 28.05.1977 in Wiesbaden
Schulbildung	1983-84 Grundschule in Trebur 1984-87 Deutsche Schule in Johannesburg/Süd-Afrika 1987-92 Kant Gymnasium in Rüsselsheim 1992-96 Colegio Humboldt, Deutsche Schule in Caracas/Venezuela 1996 Deutsches Abitur
Studium	1996-2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität in München
Beruflicher Werdegang	2003-2005 Promotion am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München 2003 Praktikum in der Seehundaufzucht- und Forschungsstation in Norddeich 2004 ‘1 st Shourt Course for Young Parasitologists’, Würzburg Giardia Studie, CEVA

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. K. Pfister danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die Korrektur der Arbeit und ganz besonders für seine stets sehr freundliche Anteilnahme und motivierende Unterstützung.

Bei Frau Dr. Y. Gall, Herrn Dr. J. Hirzmann und Frau Priv.-Doz. Dr. M. Zahler-Rinder möchte ich mich ganz herzlich für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung der Laborarbeit bedanken. Frau Dr. Y. Gall und Herrn Dr. J. Hirzmann danke ich zudem besonders für die geduldige Unterstützung bei Erstellung und Korrektur dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. B. Wilske und Herrn Dr. V. Fingerle vom Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Nationales Referenzzentrum für Borreliose, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und –materials und einer sehr konstruktiven und freundlichen Zusammenarbeit. Frau C. Hizo-Teufel und Frau Dr. rer. nat. U. Schulte-Spechtel möchte ich für ihre besonders freundliche, hilfsbereite und unermüdliche Unterstützung bei der Laborarbeit, der Erstellung der Arbeit und das ausgesprochen nette Arbeitsklima danken.

Zudem möchte ich Herrn Dr. P.H. Boss und allen Tierärzten für ihre Bemühungen beim Absammeln und Einsenden von Zecken danken.

Herrn Dr. B. Rutti danke ich für die großzügige Bereitstellung von Erregerstämmen.

Ein besonderer Dank gilt zudem allen Mitarbeitern des Instituts für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie für ihre stets unterstützende Art, die Kollegialität, und die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Sandra Koch und Tanja Seehaus danke ich ganz besonders für die äußerst nette und freundschaftliche Zusammenarbeit und die immer gute Laune. Dr. Thorsten Brendl und Franz Thoma gilt mein ganz besonderer Dank für ihre große Hilfsbereitschaft.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die zu jedem Zeitpunkt für mich da waren und mich in allen Belangen unterstützt haben.