

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Jürgen Heesemann

**Entwicklung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden
zur Spezies- und OspA-Typ-Differenzierung von
*Borrelia burgdorferi sensu lato***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Holger Michel
aus Heidelberg
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Wilske

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel
Priv. Doz. Dr. Dr. H. Rinder

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. V. Fingerle

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2005

für meine Eltern

I. Einleitung	1
I.1. Geschichtlicher Überblick.....	1
I.2. Epidemiologie.....	2
I.2.1. Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i> , Wirtsbefall und Borreliendurchseuchung.....	2
I.2.2. Saugakt, Entfernung der Zecke und Prophylaxe.....	2
I.3. Der Erreger <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	3
I.3.1. Morphologie und systematische Einordnung.....	3
I.3.2. Heterogenität der Borrelien (pathogenetische Aspekte).....	4
I.4. Die Klinik der Lyme-Borreliose.....	6
I.5. Diagnostik der Lyme-Borreliose.....	7
I.6. Therapie der Lyme-Borreliose.....	9
I.7. Impfung gegen die Lyme-Borreliose.....	10
I.8. Nachweis und Differenzierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato in epidemiologischen Studien.....	11
I.9. Zielsetzung der Arbeit.....	13
II. Material und Methoden	14
II.1. Biologisches Material.....	14
II.1.1. Zecken.....	14
II.1.2. Klinisches Material.....	14
II.2. Kultivierung der Borrelienstämme.....	15
II.3. Präparation der DNA.....	15
II.3.1. DNA-Extraktion aus Zecken.....	16
II.3.2. DNA-Extraktion aus Patientenmaterialien.....	16
II.3.3. DNA-Extraktion aus Borrelienkulturen.....	16
II.3.4. Quantifizierung der Borrelien.....	17
II.4. Agarosegel-Elektrophorese.....	17
II.5. DNA Sequenz-Alignment.....	18
II.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
II.6.1. Prinzip.....	18
II.6.2. Qualitäts- und Kontaminationskontrolle.....	19
II.6.3. Primerauswahl.....	19
II.6.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	20
II.6.5. Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung.....	22

II.7.	Restriktionsenzymverdau.....	23
II.8.	DNA Sequenzierung.....	26
II.9.	Multiplex-PCR.....	27
II.10.	LightCycler.....	28
II.10.1.	Prinzip.....	28
II.10.2.	Verwendete Primer und Hyb-Probes.....	31
II.10.3.	Reaktionsbedingungen.....	32
II.10.4.	Auswertung.....	33
II.10.5.	Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmungen.....	34
II.11.	Statistik.....	34
II.12.	Materialien.....	34
II.12.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	34
II.12.2.	Kulturmedien.....	35
II.12.3.	Enzyme.....	36
II.12.4.	Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits.....	36
II.12.5.	Chemikalien.....	37
III.	Ergebnisse	38
III.1.	Entwicklung der <i>ospA</i> -PCR.....	38
III.1.1.	Auswahl der Primer.....	38
III.1.2.	Optimierung der Reaktionsansätze.....	40
III.1.3.	Optimierung der Reaktionsbedingungen.....	41
III.1.4.	<i>In vitro</i> Sensitivitätstestung (analytische Sensitivität).....	42
III.1.5.	Evaluierung der Spezifität.....	44
III.2.	Typisierung der Borrelien-DNA mit Restriktions-Fragment-Längen- Polymorphismus (RFLP).....	45
III.3.	Multiplex-PCR.....	48
III.4.	LightCycler.....	50
III.4.1.	Primervergleich.....	50
III.4.2.	Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmungen.....	51
III.4.3.	Typisierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato mit Hyb-Probes.....	53
III.5.	Vergleich der verschiedenen Methoden.....	57
III.6.	Untersuchung von nüchternen Zecken.....	61
III.6.1.	Prävalenz.....	61

III.6.2. Spezies-Differenzierung der detektierten Borrelien.....	62
III.6.3. OspA-Subtypisierung von <i>Borrelia garinii</i>	64
III.6.4. Doppelinfektionen.....	66
III.7. Differenzierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato in klinischem Material....	66
III.7.1. Borrelienkulturen.....	66
III.7.2. Direkte Untersuchung von Patientenmaterial.....	70
IV. Diskussion.....	73
IV.1. <i>ospA</i> -PCR.....	73
IV.2. Typisierung der Borrelien mittels RFLP-Analyse.....	75
IV.3. Multiplex-PCR.....	77
IV.4. LightCycler.....	79
IV.5. Untersuchung der Zecken.....	82
IV.5.1. Prävalenz.....	82
IV.5.2. Spezies und OspA-Typenverteilung.....	83
IV.6. Untersuchung von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato aus klinischem Material....	85
IV.7. Schlussfolgerungen und Ausblick.....	89
V. Zusammenfassung.....	93
VI. Literaturliste.....	95
VII. Anhang.....	109

Häufig verwendete Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
EG	Englischer Garten
EM	Erythema migrans
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
OspA	outer surface protein A
OspC	outer surface protein C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
<i>T.</i>	<i>Treponema</i>
Tab.	Tabelle
T_m	Schmelztemperatur

I Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionserkrankung in der nördlichen Hemisphäre. In Europa liegt die Inzidenz der Erkrankung nach Schätzungen zwischen 16 und 140 / 100000 Einwohner [121;179]. Für Deutschland ist es schwierig genaue Daten zu erhalten, da für die Lyme-Borreliose keine allgemeine Meldepflicht besteht. In Studien aus dem süddeutschen Raum wird eine Inzidenz von 0,1 - 0,7 % angegeben [83;152]. Die Prävalenz von *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato (s.l.) im Vektor *Ixodes (I.) ricinus* liegt in Süddeutschland wie in den meisten Gebieten Europas zwischen 10 und 20 % [51;62]. Die Wahrscheinlichkeit, nach einem Zeckenstich an einer Lyme-Borreliose zu erkranken, beträgt in Europa 0,4 – 4 % [105;126;172].

I.1. Geschichtlicher Überblick

In den Jahren 1972 bis 1976 trat in dem Ort Lyme, Connecticut (USA), eine zunächst als 'Lyme-Arthritis' bezeichnete endemische Form der Arthritis auf [185]. Auffallend war ein ringförmiges, sich ausbreitendes Erythem, das bei etwa einem Viertel der Patienten einige Wochen vor dem Auftreten der Arthritis zu beobachten war. Die lokale und saisonale Häufung der Erkrankung legte eine Übertragung durch Arthropoden nahe [186]. Aufgrund seiner charakteristischen Verlaufsform wurde das sogenannte 'Erythema chronicum migrans' schnell ein wichtiger diagnostischer Marker der neuen Erkrankung [184]. In einer weiteren Studie konnten zahlreiche parallel dazu auftretende Begleitsymptome wie Müdigkeit, Fieber, Kopf- und Rückenschmerzen, Myalgien, Übelkeit und Erbrechen beobachtet werden. Seltener Manifestationsformen waren myokardiale Reizleitungsstörungen und neurologische Auffälligkeiten wie lymphozytäre Meningitis und Gesichtsnervenlähmungen [184]. Ohne den Erreger der als 'Lyme disease' bezeichneten Erkrankung zu kennen, identifizierte man in weiteren epidemiologischen Studien die Zecken *I. scapularis* und *I. pacificus* [181;183] als Vektoren für die Übertragung. Erst 1982 gelang Willy Burgdorfer die Isolierung einer bisher unbekanntes Spirochäte aus dem Mitteldarm einer Zecke und damit - wie sich später herausstellte - die Anzucht des Erregers der 'neuen' Erkrankung [36]. Im weiteren erfolgte auch die Isolierung aus Patientenmaterial wie Hautbiopsien, Serum und Liquor [24;182]. Im Jahr 1984 beschrieb Johnson den Erreger der 'Lyme disease' als neue Spezies *B. burgdorferi* [87]. Im folgenden gelang auch in Europa die Anzucht der Spirochäte aus Haut und Liquorproben [4;10;143;146;148].

Ohne Ätiologie, Zusammenhang oder Erreger zu erkennen, beschrieben Forscher in Europa schon viele Jahre früher die einzelnen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose. Das ‚Erythema chronicum migrans‘ war schon 1910 von Afzelius [5] bzw. 1913 von Lipschütz [100] als Hauterkrankung charakterisiert worden. Bereits damals postulierten sie eine Übertragung durch Zecken der Art *I. ricinus*. Einige Jahre später fielen neurologische Erkrankungen in Folge des Erythema chronicum migrans auf, jedoch auch hier ohne dass ein Erreger identifiziert werden konnte [14;15;61;70]. Die früheste Beschreibung einer Manifestation der Lyme-Borreliose lieferte Buchwald 1883 mit seiner Schilderung der Acrodermatitis chronica atrophicans [32].

I.2. Epidemiologie

I.2.1. Der Vektor *Ixodes ricinus*, Wirtsbefall und Borreliendurchseuchung

Die Lyme-Borreliose wird durch verschiedene Zecken Spezies der Gattung *Ixodes* [34] übertragen. Als europäischer Vektor hat dabei die Art *I. ricinus* eine herausragende Bedeutung. *I. ricinus* durchläuft von der Larve über die Nymphe zur adulten Zecke drei verschiedene Entwicklungsstadien, wobei zur Weiterentwicklung in jedem dieser Stadien eine Blutmahlzeit notwendig ist [88;177;178]. Die Durchseuchungsrate mit *B. burgdorferi* s. l. nimmt dabei von durchschnittlich 1 % bei Larven über 10 % bei Nymphen und 20 % bei adulten Zecken zu [51;222]. Die Zecken erwerben *B. burgdorferi* s.l. also überwiegend durch Blutmahlzeiten im Laufe ihrer Entwicklung, eine transovarielle Übertragung ist selten. Als wichtigstes Reservoir für die Borrelien werden dabei in Europa *Apodemus* Mäuse angesehen [63].

I. ricinus, auch der gemeine Holzbock genannt, verbringt über 90 % seiner Lebenszeit ohne Wirt [88;118]. Die Zecke hält sich bei der Wirtssuche in der bodennahen Vegetation auf. Unterstützt durch hochsensible Sinnesorgane in den Vorderbeinen, den Haller’schen Organen, erkennt sie einen nahenden Wirt durch physikalische Stimuli wie Temperatur und Vibrationen (chemische Signale wie CO₂ und NH₃ stellen v.a. bei der aktiven Wirtssuche wichtige Stimuli dar). Mit ihren ausgestreckten Vorderbeinen, die mit einem speziellen Halteapparat ausgestattet sind, hält sie sich am Wirt fest und lässt sich von ihrem Sitzplatz abstreifen. Die anschließende Suche nach einer geeigneten Stelle zum Saugen kann mehrere Stunden dauern.

I.2.2. Saugakt, Entfernung der Zecke und Prophylaxe

Bevor der eigentliche Stechapparat, das Hypostom, in die Haut eingeführt wird, ritzt die Zecke diese mit den paarig angelegten Cheliceren an [88]. Durch das Hypostom werden im

folgenden mehrere in den Speicheldrüsen produzierte Substanzen, wie Zement zur Verankerung, sowie verschiedene Enzyme, Vasodilatoren, anti-inflammatorische, gerinnungshemmende und immunsuppressive Stoffe in die Haut abgegeben [153]. Erst nach 24 – 36 Stunden beginnt die Zecke mit dem eigentlichen Saugen. Weibliche Adulte können dabei das 200-fache ihres Körpergewichts aufnehmen [177]. Durch den kontinuierlich während des Saugakts abgegebenen Speichel können Krankheitserreger wie *B. burgdorferi* s.l. auf den Wirt übertragen werden. Da die Übertragungswahrscheinlichkeit mit der Dauer des Saugakts ansteigt, sollten Zecken möglichst frühzeitig vom Körper entfernt werden [89].

Zur Entfernung der Zecke empfiehlt das Robert-Koch-Institut [29] die Verwendung von spitzen Pinzetten oder Fingernägeln. In leicht drehender Bewegung sollte man die gesamte Zecke aus der Haut entfernen, ohne dabei den Zeckenleib zu knicken oder zu quetschen. Die Verwendung von Ölen, Alkohol und anderen aggressiven Mitteln ist nicht ratsam, da diese möglicherweise eine Erregerübertragung beschleunigen. Nach der Entfernung sollte die Haut gründlich desinfiziert werden.

Die beste Prophylaxe vor Zeckenstichen ist es, Zeckenbiotope zu meiden. Ansonsten empfiehlt es sich, lange, helle und möglichst geschlossene Kleidung zu tragen. Durch ein sorgfältiges Absuchen des Körpers nach Exposition können auch versteckte Zecken gefunden und entfernt werden. Das Auftragen von Repellents wie topischem DEET (N,N-diethyl-m-toluamide) auf die Haut und die Behandlung der Kleidung mit Permethrin kann ebenfalls einen guten Schutz bieten [60;76].

I.3. Der Erreger *Borrelia burgdorferi* sensu lato

I.3.1. Morphologie und systematische Einordnung

Die 1982 von Willy Burgdorfer entdeckte ‚Lyme-disease‘ Spirochäte ließ sich aufgrund vergleichender Untersuchungen als neue Art dem Genus *Borrelia* in der Familie der *Spirochaetaceae* zuordnen [36;85;87]. Ursprünglich wurde sie auf der Grundlage weniger bekannter Isolate aus den USA als homogene Spezies *Borrelia burgdorferi* beschrieben. Immunologische Untersuchungen vieler in der Folgezeit isolierter Stämme ergaben jedoch besonders in Europa eine größere Heterogenität [22;218;220]. Mittlerweile wurden mindestens elf verschiedene Genospezies definiert, die unter dem Namen *B. burgdorferi* s.l. zusammengefasst werden: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii*, *B. garinii* [17], *B. valaisiana* [199], *B. lusitaniae* [95], *B. japonica* [90], *B. andersonii* [107], *B. tanukii*, *B. turdi* [59], *B. bissettii* [142] und *B. sinica* [110]. In Europa ist für die Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* eine Humanpathogenität gesichert [16]. Da *B. valaisiana*-DNA in

Hautbiopsien von Patienten mittels PCR detektiert werden konnte, wird eine Humanpathogenität für diese Spezies vermutet [157]. Ein weiteres, genotypisch und phänotypisch neues Isolat (A14S) des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes wurde 1999 aus einer Hautbiopsie eines Patienten mit Erythema chronicum migrans angezüchtet [197] und im folgenden auch von Wilske et al. beschrieben [205].

Borrelien sind gramnegative, microaerophile, mobile, etwa 20 µm lange und 0,3 µm dicke Spirochäten mit unregelmäßigen Windungen. Unter der äußeren Zellmembran liegen sieben bis elf Endoflagellen, die es den Bakterien ermöglichen, sich schraubenförmig fortzubewegen [21]. *B. burgdorferi* s.l. lässt sich auf Spezialnährböden bei Temperaturen zwischen 30 und 34 °C kultivieren [18;147]. Unter geeigneten Wachstumsbedingungen können Borrelien eine Generationszeit zwischen 8 und 30 Stunden erreichen und auf eine Zelldichte bis zu 10^8 Zellen / ml Medium heranwachsen [145].

Das Genom von *B. burgdorferi* s.l. besteht aus einem linearen Chromosom mit einer Länge von etwa 950 kb und mehreren zirkulären und linearen Plasmiden [19;20;40;48;58]. Der G+C Gehalt des Genoms ist allgemein niedrig und liegt auf dem Chromosom und den Plasmiden des Typstamms B31 zwischen 23,1 und 32,3 % [58]. Wichtige Oberflächenproteine der Borrelien wie das ‚Outer surface protein A‘ (OspA) und das ‚Outer surface Protein C‘ (OspC) werden auf den Plasmiden kodiert. Das *ospA*-Gen liegt auf einem linearen Plasmid und wird gemeinsam mit dem *ospB*-Gen in einer Transkriptionseinheit reguliert [25;77]. OspA und OspC scheinen eine wichtige Rolle bei der Anpassung der Borrelie an das Habitat Zecke bzw. Säugetier zu spielen. OspA wird von den Borrelien überwiegend in der nüchternen Zecke exprimiert [52;176]. Die Expression von OspC hingegen wird erst bei Blutkontakt während des Saugakts aktiviert [53;54;57;175]. Im Säugetierwirt findet man hauptsächlich OspC-Antikörper - ein Hinweis darauf, dass die Borrelien hier OspC und kein OspA exprimieren [218].

I.3.2 Heterogenität der Borrelien (pathogenetische Aspekte)

Während *B. burgdorferi* s.s. in den USA die einzige pathogene Spezies darstellt, kommen in Europa die humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* vor. Untersuchungen an den OspA- und OspC-Proteinen europäischer Isolate ergaben, im Gegensatz zu den Ergebnissen in den USA, eine ausgeprägte Heterogenität [207;215;216;220]. Auf der Grundlage der unterschiedlichen Reaktivität mit monoklonalen Anti-OspA-Antikörpern definierte Wilske et al. sieben verschiedene OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s.l.. Die Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* sind homogen in ihrem OspA-

Typ und entsprechen jeweils OspA-Typ 1 bzw. OspA-Typ 2. Der im OspA-Typ heterogeneren Spezies *B. garinii* lassen sich hingegen fünf OspA-Typen (3 bis 7) zuordnen [215]. Später wurde *B. garinii* noch ein weiterer Serotyp (OspA-Typ 8) zugeordnet [208]. Das OspA-Phänotypisierungsschema ließ sich durch Sequenzanalysen des *ospA*-Gens auch auf genetischer Ebene bestätigen [204].

Die Heterogenität der Borrelien ist besonders in Bezug auf die Pathogenitätsforschung von großer Bedeutung. Untersuchungen an zahlreichen Borrelienstämmen ließen eine Assoziation der verschiedenen Spezies und OspA-Typen mit unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose vermuten [192;215]. *B. afzelii*, also OspA-Typ 2, scheint eng mit Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose verbunden zu sein - besonders mit dem Auftreten einer Acrodermatitis chronica atrophicans [12;13;192]. Eine Infektion mit *B. garinii* ist möglicherweise mit der Entwicklung einer Neuroborreliose assoziiert [192]. So ist *B. garinii* in den meisten europäischen Studien zur Typisierung von Liquorisolaten die am häufigsten gefundene Spezies [13;37;99;192;208]. Allerdings war *B. garinii* in Untersuchungen an Zeckenisolaten ebenfalls die prädominante Spezies [209;215], so dass eine echte pathogenetische Assoziation von *B. garinii* mit der Neuroborreliose fraglich ist [211]. Erst ein Vergleich der Verteilung der verschiedenen OspA-Typen von *B. garinii* (Typ 3 bis 7) zeigt dagegen deutliche Unterschiede zwischen Zecken- und Liquorisolaten, was interessante Fragestellungen aufwirft [209]: Während OspA-Typ 4 etwa ein Viertel der Liquorisolaten ausmacht [208], konnte dieser OspA-Typ aus Zecken bisher nur einmal angezüchtet werden [78]. Umgekehrt findet man OspA-Typ 6 sehr häufig unter Zeckenisolaten, relativ seltener in Patientenmaterial (Abb 1.1.). Unterschiedliche Prävalenzen bei Zecken und Patienten lassen möglicherweise Rückschlüsse auf das pathogene Potenzial der einzelnen OspA-Typen zu.

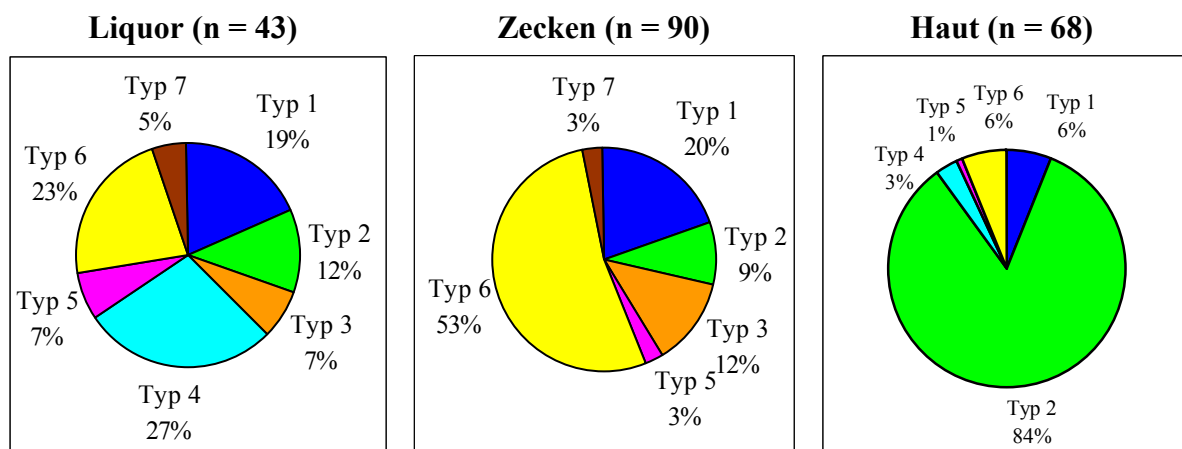


Abb 1.1.: Untersuchungen zur unterschiedlichen Verteilung der OspA-Typen in europäischen Liquor-, Zecken- und Hautisolaten (Wilske et al. 1996).

I.4. Die Klinik der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, die sich primär als lokale Hautinfektion (Erythema migrans) manifestiert. Innerhalb von Tagen bis Wochen können die Borrelien jedoch disseminieren und eine Vielzahl von Symptomen hervorrufen; besonders am zentralen Nervensystem, den Gelenken, der Haut und am Herzen. Dabei ist das klinische Bild variabel. Die Symptome treten sowohl getrennt, als auch in unterschiedlichen Kombinationen auf [41;124;133;180]. Der Verlauf und die verschiedenen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose werden in drei Stadien eingeteilt: In die Frühmanifestationen (Stadium I und II) und die Spätmanifestationen (Stadium III). Die Stadien treten unabhängig voneinander auf, ein klinisch erfassbares Durchlaufen der Frühstadien vor den Spätmanifestationen ist nicht erforderlich [180]. Im natürlichen Verlauf ist die Erkrankung meist selbstlimitierend, in Einzelfällen können aber Borrelien selbst nach antibiotischer Behandlung im Gewebe persistieren und dabei zu Symptomen führen [144].

Stadium I (Erythema migrans):

Das Erythema migrans, auch ‚Wanderröte‘ genannt, gilt als häufigste Frühmanifestation und Leitsymptom der Lyme-Borreliose. Es wird in etwa 90 % der Fälle mit objektivem Nachweis einer Infektion beobachtet [83;115]. Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich bildet sich um die Einstichstelle eine makulo- bis papulöse Effloreszenz, die sich im weiteren Verlauf zu einem zentral ablassenden, zentrifugal expandierenden ringförmigen Erythem entwickelt [5;184]. Ausdehnung, Farbe und Dauer sind variabel. Begleitend können Allgemeinsymptome wie Fieber, Kopfschmerz und Myalgien auftreten.

Stadium II:

Neurologische Manifestationsformen herrschen im zweiten Stadium der Erkrankung Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich vor. Vorrangig kommt es zu einer auch als ‚Bannwarth-Syndrom‘ bezeichneten lymphozytären Meningoradikulitis. Typisch hierfür sind radikuläre Schmerzsyndrome mit starken, brennenden, sich nachts verschlimmernden Schmerzen und Hirnnervenparesen (typischerweise Facialisparesen). Rumpf- oder Extremitätenparesen sind selten. Meningitis sowie isolierte Facialisparesen ohne meningitische Zeichen, finden sich bei Kindern häufiger als bei Erwachsenen. Diagnostisch wegweisend sind Liquorbefunde, wie erhöhter Eiweißgehalt und lymphozytäre Pleozytose [132]. Das Borrelien-Lymphozytom ist eine besondere Hautmanifestation, die dem Stadium II der Erkrankung zugeordnet wird. Es handelt sich um einen rötlich-lividen Tumor mit Vorzugslokalisation an Ohr läppchen,

Skrotum oder Mamille [202]. Als Folge hämatogener Streuung der Erreger kommen multiple Erytheme vor. Dies wird in den USA häufiger beobachtet als in Europa [217]. Ebenfalls in diesem Stadium kann eine Lyme-Karditis auftreten, die durch Herzrhythmusstörungen in seltenen Fällen eine vitale Bedrohung darstellt [45;194].

Stadium III:

Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich treten die Lyme Arthritis und die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) in Erscheinung. Die Lyme Arthritis verläuft meist intermittierend mit asymptomatischen Intervallen. Oft kommt es auch zu Spontanremissionen; chronische Verläufe sind selten. Charakteristisch ist eine mono- oder asymmetrisch-oligoartikuläre, schmerzhafte Gelenkschwellung. Am häufigsten ist das Kniegelenk betroffen [72-74;184;186]. Die ACA, welche fast ausschließlich in Europa beobachtet wird, tritt nach einer langen Inkubationszeit (bis zu Jahren) auf. Nach infiltrativen Vorstadien kommt es letztendlich zu einer Atrophie der Haut mit livider Verfärbung, zigarettenpapierartiger Fältelung und plastischer Vorwölbung der Gefäße [11;71]. Sehr selten kann sich in Stadium III auch eine chronische Borrelien-Enzephalomyelitis entwickeln, die unter anderem durch Para- und Tetraparesen in Erscheinung treten kann [3]. Die diagnostisch wichtige Liquoruntersuchung ergibt meist eine starke Eiweißhöhung bei dezenter Erhöhung der Zellzahl.

I.5. Diagnostik der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose ist in erster Linie eine klinische Diagnose. Klinische Befunde sind richtungsweisend für die Diagnosefindung und notwendig zur Interpretation zusätzlicher mikrobiologischer Untersuchungen. Andererseits ist bei einem Fehlen pathognomonischer Symptome wie z.B. dem Erythema migrans, oft zusätzliche Diagnostik notwendig, um den klinischen Verdacht zu erhärten. Serologische Verfahren werden dabei in der Praxis am häufigsten eingesetzt. Als Ergänzung kann der direkte Erregernachweis eine wertvolle Hilfe darstellen [223] – etwa bei atypischen Fällen oder in Frühstadien der Erkrankung, wenn noch keine Antikörperbildung stattgefunden hat.

Antikörpernachweis (Serologische Diagnostik):

In der Regel beginnt eine messbare systemische Immunantwort auf eine Borrelieninfektion mit dem Anstieg von IgM-Antikörpern nach etwa drei, und von IgG-Antikörpern nach etwa sechs Wochen [180]. In frühen, lokalisierten Krankheitsstadien wie dem Erythema migrans

kann die Antikörperbildung noch fehlen (Sensitivität der Serologie: 20 – 50 %). In Stadium II sind IgG Antikörper im Serum in 70 – 90 % der Fälle nachweisbar [223]. Zusätzlich findet man bei der Neuroborreliose häufig eine intrathekale Antikörperproduktion [206]. Das Stadium III, besonders die ACA, ist typischerweise (90 – 100 %) durch hohe IgG Titer gekennzeichnet, während IgM diagnostisch praktisch keine Rolle spielt [212;221;223].

Für die serologische Diagnostik der Lyme-Borreliose wird eine Stufendiagnostik empfohlen [223]. In einem ersten Schritt sollte ein Screening-Verfahren mit hoher Sensitivität verwendet werden, normalerweise ein IgG- und ein IgM-ELISA. Reaktive Ergebnisse müssen durch einen Ig-Klassen spezifischen Immunoblot als Bestätigungstest verifiziert werden [1;82;223]. Für die Diagnostik sind eine Reihe von Antigenen, u.a. p41int, p83 / 100, p39, p58 und Osp17, OspA und OspC von Bedeutung [223]. Seit kurzem existieren Tests der sogenannten ‚dritten Generation‘, in denen die Antigene in rekombinanter Form verwendet werden [212]. Für jeden Test müssen in Studien Interpretationskriterien entwickelt und die Sensitivität und die Spezifität ermittelt werden [223].

Bei Verdacht auf Neuroborreliose sollte man stets ein Liquor-Serum-Paar vom selben Tag untersuchen, um eine intrathekale Antikörperproduktion nachzuweisen (Liquor-Serum-Index). Dies gelingt je nach Stadium und Untersuchungszeitpunkt in etwa 70 - 90 (bis 100 %) der Fälle [67;206].

Direkter Erregernachweis:

Der direkte Erregernachweis stellt bei der Abklärung von atypischen Krankheitsverläufen (z.B. atypisches Erythema migrans), bei (noch) negativer Serologie, und bei der Diagnostik der Lyme Arthritis ein wichtiges Hilfsmittel dar [171].

Wegen der geringen Erregerzahl in klinischem Material müssen sensitive Methoden, wie der kulturelle Nachweis oder die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), verwendet werden. Wie in Kapitel 1.3.1. beschrieben, lässt sich *B. burgdorferi* s.l. mit Hilfe von Spezialnährmedien kultivieren [18;147]. Die Kultivierung stellt zwar immer noch den Goldstandard für einen Erregernachweis dar, ist aber aufgrund der langen Generationszeit der Borrelien sehr arbeits- und Zeit aufwändig [96]. Die PCR, eine enzymatische Vervielfältigung von DNA (siehe Kap. 2.6.), wurde 1989 erstmals für *B. burgdorferi* beschrieben [161] und hat seitdem breite Anwendung in epidemiologischen und klinischen Studien gefunden. Die Sensitivität von Kultivierung und PCR ist bei Hautbiopsien und Liquorpunktate vergleichbar. Bei der Untersuchung von Gelenkspunktaten ist die PCR deutlich sensitiver (Tab. 1.1.). Ein kultureller Nachweis gelingt hier nur selten [205]. Beide Methoden sind für einen

Routineeinsatz noch nicht ausreichend standardisiert und sollten nur in spezialisierten, dafür ausgerüsteten Labors verwendet werden [205]. Zudem sollten nur Protokolle zur Anwendung kommen, die eine Differenzierung der drei humanpathogenen Spezies erlauben [157].

Tab. 1.1.: Erfolgsrate beim Erregernachweis. Vergleich von Kultur und PCR.

Untersuchungsmaterial	Erfolgsrate
Haut (Erythema migrans, ACA)	50 – 70 % mit Kultur oder PCR
Liquor (Neuroborreliose II)	10 – 30 % mit Kultur oder PCR
Gelenkpunktat (Lymearthritis)	50 – 70 % mit PCR (Kultur sehr selten positiv)

(modifiziert nach Wilske et al. 2000 [223])

Der mikroskopische Nachweis von Borrelien in klinischem Material ist weder mit Standard-Färbungen (z. B. Fuchsinfärbung), noch mit immunhistochemischen Methoden zufriedenstellend [211]. Diese Methode eignet sich jedoch gut für epidemiologische Studien zum Nachweis von Borrelien in Zecken. Auch hier ist jedoch viel Erfahrung notwendig, um Artefakte von Borrelien in positiven Zecken zu unterscheiden [52].

I.6. Therapie der Lyme-Borreliose

Alle Stadien der Lyme-Borreliose bedürfen einer möglichst frühzeitigen antibiotischen Therapie. Dies gilt auch für die oft selbstlimitierenden Frühstadien, da so das Auftreten von Spätmanifestationen in fast allen Fällen verhindert wird. Bei eindeutiger Klinik ist die Therapie auch ohne mikrobiologische Befunde sofort zu beginnen [210]. Antibiotikum, Dauer und Dosierung richten sich nach dem Stadium der Erkrankung und dem klinischen Bild (Tab. 1.2.). Für die Behandlung des Erythema migrans ist in der Regel eine 14-tägige Therapie mit Tetrazyklinen (Doxycyclin) indiziert. Die akute Neuroborreliose wird meist mit einer zweiwöchigen intravenösen Gabe von Cephalosporinen (Ceftriaxon) therapiert [115]. Dadurch nehmen radikuläre Schmerzen, Meningismus und Kopfschmerzen rasch ab; bestehende Muskelparesen bilden sich jedoch nicht signifikant schneller zurück. Spätstadien der Lyme-Borreliose erfordern in der Regel eine drei bis vierwöchige Antibiotikatherapie [210].

Tab 1.2.: Stadienabhängige Therapie der Lyme-Borreliose (nach Wilske 2000 [210]).

Klinische Manifestation	Antibiotikum	Dosierung pro Tag	Applikation	Dauer (Tage)
Erythema migrans (EM)	Doxycyclin*	1 x 200 mg	p. o.	14
Borrelien-Lymphozytom	Amoxicillin*	2 x 1000 mg	p. o.	14
	Azithromycin*	2 x 500 mg	p. o.	1. Tag
		dann 1 x 500 mg	p. o.	2.-5. Tag
	oder			
	Azithromycin	1 x 500 mg	p. o.	10
	Ceftriaxon*	1 x 1g	i. m.	5
	Minocyclin*	2 x 100 mg	p. o.	14
	Cefuroxim*	1 x 500 mg	p. o.	14
	Penicillin V*	3 x 1 g	p. o.	14
Akute Neuroborreliose	Ceftriaxon*	1 x 2 g	i. v.	14
Karditis	Cefotaxim*	3 x 2 g	i. v.	14
	Penicillin G*	4 x 3 g	i. v.	14
Arthritis	Ceftriaxon*	1 x 2 g	i. v.	21
	Cefotaxim*	3 x 2 g	i. v.	21
	Penicillin G*	4 x 3 g	i. v.	21
	Doxycyclin*	1 x 200 mg	p. o.	28
Acrodermatitis chronica atrophicans	Doxycyclin*	1 x 200 mg	p. o.	21
	Amoxicillin*	2 x 1000 mg	p. o.	21
	Ceftriaxon*	1 x 2 g	i. v.	21
	Cefotaxim*	3 x 2 g	i. v.	21
	Penicillin G*	4 x 3 g	i. v.	21
Chronische Neuroborreliose	Ceftriaxon*	1 x 2 g	i. v.	21
	Cefotaxim*	3 x 2 g	i. v.	21
	Penicillin G*	4 x 3 g	i. v.	21

* jeweils alternativ; i. m. = intramuskulär; i. v. = intravenös; p. o. = oral

I.7. Impfung gegen die Lyme-Borreliose

Verschiedene Arten von Impfstoffen wie Ganz-Zell Vaccine [86], Vaccine aus attenuierten flagellenlosen Mutanten [164] und Vaccine auf der Basis rekombinanter Proteine [49] sind in der Vergangenheit getestet worden. Dabei haben sich die Proteine OspA und OspC als aussichtsreichste Kandidaten herausgestellt [208]. Ein Impfstoff gegen *B. burgdorferi* s.s. auf der Basis von rekombinantem OspA war seit Dezember 1998 in den USA zugelassen [2], wurde aber im Sommer 2002 aus wirtschaftlichen Gründen vom Markt genommen. Studien bescheinigten dieser Impfung eine hohe Effizienz [187]. Wichtig für das Funktionsprinzip der OspA-Impfung ist, dass OspA von den Borrelien sehr gut im Zeckendarm, aber praktisch nicht im Säugetierwirt exprimiert wird. Durch den Blutkontakt während des Saugakts kommt es zur Runterregulierung von OspA und einer Hochregulierung von OspC, jedoch erst nach einem bestimmten Zeitintervall [57;175]. Die durch die Impfung induzierten Antikörper gegen OspA gelangen zu Beginn des Saugakts in den Zeckendarm und töten dort die

Borrelien ab. Es handelt sich somit bei der OspA-Impfung um ein völlig neues Wirkungsprinzip, da schon die Übertragung der Borrelien durch den Vektor unterbunden wird, diese also gar nicht erst in den Säugetierwirt gelangen [190].

In Europa macht die beschriebene Heterogenität der Borrelien eine Impfstoffentwicklung wesentlich komplexer [209]. In mehreren Studien konnte man zeigen, dass OspA-Antikörper gegen einzelne Borrelien-Stämme (bzw. Spezies) aufgrund immunologischer Unterschiede nicht protektiv gegen andere sind [50;103;104;169]. Somit bietet der monovalente Impfstoff gegen *B. burgdorferi* s.s aus den USA in Europa keinen zuverlässigen Schutz. Hier müssen die verschiedenen prävalenten und pathogenen Borrelien bei der Entwicklung einer Impfung beachtet werden [103]. Als Grundvoraussetzung hierfür sind Daten zur Prävalenz und Verteilung der verschiedenen Spezies und OspA-Typen in Patienten und Zecken in Europa, sowie Wissen über ihr jeweiliges pathogenes Potenzial von großer Bedeutung.

I.8. Nachweis und Differenzierung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in epidemiologischen Studien

Sowohl bei impf-prophylaktischen, als auch bei klinischen und pathogenetischen Forschungen, spielt die Heterogenität von *B. burgdorferi* s.l. in Europa eine entscheidende Rolle (s. Kap. I.7. und I.3.2.). Epidemiologische Untersuchungen zu Prävalenzraten und Differenzierung der gefundenen *B. burgdorferi* s.l. in Zecken und Patientenmaterial liefern hier essentielles Grundlagenwissen für weitere Entwicklungen.

Differenzierung von *B. burgdorferi* s.l.:

Eine Reihe verschiedener Methoden stehen zum Nachweis und zur Differenzierung von *B. burgdorferi* s.l zur Verfügung. Die Phänotypisierung mittels OspA-Antikörper und ihre Relevanz wurde schon in Kapitel I.3.2. beschrieben. Analog zur OspA-Typisierung ließen sich für *B. burgdorferi* s.l. mittels monoklonaler anti-OspC-Antikörper auch verschiedene OspC-Gruppen definieren. Ein Vergleich der beiden Typisierungsmöglichkeiten zeigt, dass OspC deutlich heterogener ist als OspA, vor allem innerhalb der Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*. [214;216]. Die Phänotypisierung mittels monoklonaler Antikörper stellt eine zuverlässige und einfache Typisierungsmethode dar. Sie ist jedoch abhängig von der Expression der Proteine und somit beeinflussbar durch variables Expressionsverhalten der Borrelien *in vivo* und *in vitro* [215].

Eine Typisierung auf der Ebene genetischer Charakteristika kann noch genauere Informationen zur Heterogenität von Mikroorganismen liefern [200]. Viele Methoden zur

Genotypisierung von *B. burgdorferi* s.l. wie rRNA-Restriktions-Analyse [108;139], Puls-Feld-Gel-Elektrophorese (PFGE) [23;37;38], Plasmid Fingerprinting [230], zufällig amplifizierte polymorphe DNA (engl.: **R**andomly **A**mplified **P**olymorphic **D**NA, RAPD) [201], Spezies-spezifische PCR [106], PCR basierte Analyse von **R**estriktions-**F**rangment-**L**ängen-**P**olymorphismen (RFLP) [101;140], DNA-Sequenz-Analyse [204;215] und LightCycler PCR [113;138;151] sind bisher publiziert worden. Die Auswahl der Methodik hängt von der Studie, dem gewünschten Differenzierungsgrad, dem verwendeten Material und den Möglichkeiten des Labors ab. Für epidemiologische Studien an Zecken und Patientenmaterial wird die RFLP-Analyse empfohlen. Sie ist einfach durchzuführen, kann direkt ohne Kultivierung der Borrelien angewandt werden und erlaubt eine zuverlässige Differenzierung auf der Spezies-Ebene [200]. Grundlage für diese Methode ist die Amplifikation von Borrelien-DNA mittels PCR.

Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. mittels PCR:

Die PCR, eine enzymatische Amplifikation von DNA, ist eine in epidemiologischen Studien oft verwendete und sensitive Methode zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. in Zecken und Patientenmaterial. Erstmals von Rosa et al. im Jahr 1989 für Borrelien beschrieben [161] wurden seitdem mehr als 100 PCR Protokolle mit unterschiedlichsten Primern und Zielgenen veröffentlicht. Häufig verwendete Zielsequenzen stellen dabei das *ospA*-Gen, das Flagellin Gen, chromosomale Gene (clone 2H1) und ribosomale Sequenzen wie 5S-23S und 16S rRNA Sequenzen dar [171]. Wichtiges Kriterium bei der Target- und Primerauswahl ist die Spezifität. Während die unerwünschte Amplifikation verwandter Spirochäten wie z.B. *B. hermsii* die Wahl konservierter Zielgene limitiert, wird die Primerauswahl bei weniger konservierten Genen durch die ausgeprägte Heterogenität der Borrelien kompliziert. Als Grundvoraussetzung sollte eine PCR für diagnostische und epidemiologische Fragestellungen möglichst alle pathogenen Spezies und Subtypen des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes gleichermaßen sensitiv erfassen [171].

Die seit kurzem verfügbare LightCycler PCR erlaubt eine Detektion der amplifizierten DNA nach jedem Amplifikationszyklus und somit eine Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten DNA [228]. Mit Hilfe unspezifisch interkalierender Dyes oder Hybridisierung mit fluoreszierenden Oligonukleotiden ist eine Spezifizierung des entstehenden Amplifikationsprodukts mittels Schmelzkurvenanalyse möglich. Dabei können einzelne DNA-Basen-Mutationen zuverlässig detektiert und differenziert werden [27;94]. Die bisher beschriebenen Protokolle für eine *B. burgdorferi* s.l. LightCycler-PCR verwenden das *ospA*-

Gen [151], das *recA*-Gen [151] und das *p66*-Gen [113]. Dabei gelingt bisher mit Einschränkungen eine Differenzierung bis auf Spezies-Ebene.

I.9. Zielsetzung der Arbeit

In den vorangegangenen Kapiteln wurde auf die Relevanz der Heterogenität der Borrelien in Europa von vielen Aspekten her hingewiesen. Insbesondere in Bezug auf die Verteilung der OspA-Typen existieren trotz nachgewiesener Relevanz nur wenig epidemiologische Daten.

Ein Ziel der Arbeit war die Entwicklung und Evaluierung von einfachen und routinemäßig anwendbaren PCR basierten Methoden zum Nachweis und zur Differenzierung von *B. burgdorferi* s.l.. Dabei sollte ein sensitiver Nachweis und eine zuverlässige Differenzierung aller in Europa relevanten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* möglich sein. Zusätzlich wurde eine Differenzierung aller fünf OspA-Typen von *B. garinii* angestrebt.

Als Methoden wurde die RFLP-Analyse, die Multiplex-PCR und die LightCycler-PCR ausgewählt. Die RFLP Analyse stellt eine einfache und schnelle, in vielen Labors etablierte Methode dar, die für epidemiologische Untersuchungen von *B. burgdorferi* s.l. empfohlen wird [200]. Die LightCycler-PCR ist eine moderne, sehr schnelle Methode zum Nachweis und zur simultanen Differenzierung von DNA. Mit der Multiplex-PCR sollte eine einfache Methode zum Nachweis und zur gleichzeitigen Differenzierung der klinisch relevanten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* entwickelt werden.

In einer explorativen Studie wurden Zecken aus dem südbayerischen Raum untersucht und die gefundenen Borrelien differenziert. Ziel war es, dabei die Verteilung der Spezies und OspA-Typen in 3 Gebieten zu vergleichen, und ihre Veränderung über die Zeit zu untersuchen. Solche Prävalenzdaten stellen eine essentielle Grundlage für Impfstoffentwicklung und Risikoabschätzung nach einem Zeckenstich dar.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung und Differenzierung von Borrelien in klinischem Material und Patientenkulturen. Durch den Vergleich der Verteilung in den Materialien lassen sich pathogenetische Präferenzen der verschiedenen Subtypen abschätzen.

II. Material und Methoden

II.1. Biologisches Material

II.1.1. Zecken

Von Frühjahr 2000 bis Sommer 2002 wurden in den drei Gebieten EG1, EG2 und Bad Tölz 529 *I. ricinus* Zecken gesammelt (Tab. 2.1.). Die Gebiete sind je etwa 500 m² groß. Die Distanz zwischen den Gebieten EG1 und EG2 beträgt 1 km. Sie liegen beide im Englischen Garten, einem Park im Zentrum von München mit Wiesen, Buschvegetationen und einzelnen Baumgruppen. Das Habitat Bad Tölz hingegen liegt an einem Waldrand in ländlicher Umgebung. Zum Englischen Garten beträgt die Distanz etwa 40 km. Um die Veränderung der Borrelienspopulationen über die Zeit zu untersuchen, wurden die Zecken in EG1 und EG2 jeweils in zwei verschiedenen Zeiträumen gesammelt.

Die Sammlung erfolgte durch die Fahnenmethode (engl.: flagging). Dabei zieht man ein weißes Baumwolltuch mit variierender Schlepplhöhe über den Boden. Die am Tuch haftenden Zecken wurden mit einer Pinzette abgenommen und nach Registrierung der Entwicklungsstadien getrennt in 1,5 ml Eppendorfröhrchen bei -20 °C eingefroren.

Tab 2.1.: Anzahl der im Englischen Garten (EG1, EG2) und Bad Tölz gesammelten *I. ricinus* Zecken, aufgelistet nach Sammelzeitpunkten.

Sammelgebiet	Sammelzeitraum			gesamt
	Frühjahr 2000	Frühjahr 2001	Frühjahr 2002	
EG1	110	-	31	141
EG2	71	90	-	161
Bad Tölz	227	-	-	227
Gesamt	408	90	31	529

II.1.2. Klinisches Material

Borrelienkulturen:

Insgesamt wurden 59 Borrelienkulturen aus klinischem Material getestet. Das Patientenmaterial stammte aus der Routinediagnostik des Max v. Pettenkofer-Instituts und kam hauptsächlich aus Süddeutschland. Die 40 Liquorisolat stammten von Patienten mit einer Neuroborreliose Stadium II. 18 Isolate wurden aus Hautbiopsien von Patienten mit klinischen Zeichen des Erythema migrans (Stadium I) angezüchtet. Ein Isolat stammte aus dem Kniegelenkspunktat eines Patienten mit Acrodermatitis chronica atrophicans (Stadium III) und zusätzlicher Arthritis.

Patientenmaterialien:

In einer retrospektiven Studie wurden 20 Direktmaterialien von Patienten eingeschlossen. Alle kamen aus der Routinediagnostik des Max v. Pettenkofer-Instituts, waren positiv in der Routine *ospA*-PCR und stammten überwiegend aus dem süddeutschen Raum. 13 Proben waren Hautbiopsien von Patienten mit kutanen Verlaufsformen der Lyme-Borreliose, davon sieben von Patienten mit Erythema migrans (Stadium I), drei von Patienten mit Acrodermatitis chronica atrophicans (Stadium III) und drei von atypischen kutanen Verläufen. Drei Proben stammten von Liquorpunktionen mit klinischem Verdacht auf Neuroborreliose (Stadium II) und drei von Kniegelenkspunktionen bei Patienten mit arthritischem Krankheitsverlauf. Hinzu kam die Fruchtwasserprobe einer an einem Erythema migrans erkrankten Frau .

II.2. Kultivierung der Borrelienstämme

Die Kultivierung der *B. burgdorferi* s. l. Stämme erfolgte in MKP-Medium (modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic)[147]. MKP besteht aus einem Grundmedium mit Anreicherungs Zusätzen. Der pH des Grundmediums (s. Kap. 2.12.2.) wurde mit 5 M NaOH auf 7,6 eingestellt. Nach der Sterilfiltration wurde das Grundmedium zur Aufbewahrung aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Als Anreicherung kamen zu je 1000 ml Grundmedium 200 ml siebenprozentige Gelatine, 70 ml 35-prozentiges RSA (Rinderserumalbumin) und 72 ml steriles Kaninchenserum (hitzeinaktiviert) hinzu. Anschließend wurde das fertige Medium in 6,5 ml Portionen aufgeteilt.

Die Kultivierung von Borrelien aus Patientenmaterialien erfolgte durch Zugabe von 0,5 ml der gewonnenen Punktate (Liquor-, Kniegelenkspunktat) zu 6,5 ml MKP-Medium. Die Hautbiopsien wurden nach mechanischer Zerkleinerung ebenfalls mit 6,5 ml Medium gemischt. Die Bebrütung der Kulturen erfolgte je nach Material über mindestens 6 Wochen [143;146;148] bei 33 °C. Alle acht Tage wurden die Kulturen bei 12000 U / min für 20 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Kontrolle mittels Dunkelfeldmikroskopie erfolgte die Überimpfung des Sediments in 6,5 ml neues MKP-Medium.

II.3. Präparation der DNA

Die Extraktion der DNA aus Zecken, Patientenmaterialien und Borrelienkulturen erfolgte mit dem ‚High Pure PCR Template Preparation Kit‘ nach Anweisungen des Herstellers. Die Technik basiert auf einem Proteinase K-Verdau mit anschließender Isolierung der DNA durch

Silikatsäulenaufreinigung. Dabei wird die DNA in Anwesenheit chaotropischer Salze (Guanidin-HCl) an die Säule gebunden und kann nach mehreren Reinigungsschritten mit einem Elutionspuffer eluiert werden.

II.3.1. DNA-Extraktion aus Zecken

Unter sterilen Bedingungen wurden die gefrorenen Zecken mittels Einmalspatel zerkleinert. Wichtig war dabei besonders das Auspressen des Zeckendarms, in welchem sich die Borrelien hauptsächlich befinden. Die Bruchstücke wurden in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen und gut vermischt. Nach Zugabe von 200 µl ‚Tissue lysis buffer‘ und 40 µl Proteinase K (20 mg / ml) ließ man den Ansatz bei 55 °C im Wärmeblock über Nacht inkubieren. Die Säulenaufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach Extraktion wurde die in 200 µl eluierte DNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

II.3.2. DNA-Extraktion aus Patientenmaterialien

Die Zerkleinerung der Hautbiopsien fand mechanisch unter sterilen Bedingungen statt. Anschließend wurden sie in 200 µl PBS aufgenommen und vermischt. Liquorpunktate, Kniegelenkspunktate und Fruchtwasserpunktat wurden zentrifugiert (14000 U / min, 10 min), der Überstand verworfen und das Pellet mit 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl ‚Tissue lysis buffer‘ und 40 µl Proteinase K wurde der Ansatz über Nacht bei 55 °C verdaut. Die Weiterverarbeitung erfolgte analog zur DNA Extraktion aus den Zecken.

II.3.3. DNA-Extraktion aus Borrelienkulturen

Die hochgewachsenen Borrelienkulturen wurden für 20 min bei 12000 U / min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Homogenisieren des Pellets in 1,5 ml PBS konnte das restliche Medium durch dreimaliges Zentrifugieren (12000 U / min für 20 min) und Resuspendieren in PBS weitestgehend ausgewaschen werden. Danach wurde das Pellet in 200 µl PBS aufgenommen und gut gemischt. Nach Zugabe von 200 µl ‚Tissue lysis buffer‘ und 40 µl Proteinase K (20mg / ml) folgte über Nacht der Verdau im Wärmeblock bei 55 °C. Die anschließende Weiterverarbeitung verlief analog zur DNA-Extraktion aus der Zecke.

II.3.4. Quantifizierung der Borrelien

Für die Sensitivitätsbestimmungen der PCR war eine Quantifizierung der Borrelien-DNA nötig. Wegen insuffizientem Wachstum der Borrelien auf festem Medium konnte keine Quantifizierung anhand von Kolonien bildenden Einheiten durchgeführt werden. Die Quantifizierung erfolgte deshalb durch Auszählen der Borrelien mittels Dunkelfeldmikroskopie. Dafür wurde 200 µl Medium einer hochgewachsenen Borrelienkultur entnommen und wie oben beschrieben durch mehrmaliges Zentrifugieren das restliche Medium ausgewaschen. Nach Resuspension in 200 µl PBS und Homogenisierung erfolgte, je nach Konzentration der Kultur, die Verdünnung von einem Teil des Homogenisats um den Faktor 1 / 1000 bis 1 / 10000. Von dieser Verdünnung wurden 13 µl entnommen und auf einem Objektträger (Deckglas 24 mm x 60 mm) gleichmäßig verteilt. Anschließend wurden 50 Blickfelder ausgezählt. Da der gesamte Objektträger in der gewählten Vergrößerung (400-fach) 2500 Blickfeldern entspricht, konnte unter Berücksichtigung der vorgenommenen Verdünnung die Borrelienkonzentration im ursprünglichen Homogenisat errechnet werden. Diese am Max v. Pettenkofer-Institut etablierte Methode wurde mit der Petroff Hauser Zählkammer [170] verglichen und liefert nahezu identische Ergebnisse.

II.4. Agarosegel-Elektrophorese

Die analytische Auftrennung von PCR- und Restriktionsverdauprodukten geschah mittels Agarosegel-Elektrophorese. Die DNA-Fragmente ließen sich durch ein angelegtes elektrisches Feld nach ihrer Ladung und Länge in einem zweiprozentigen Agarosegel (2,0 g Agarose / 100 ml Puffer) auftrennen und durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar machen. Als Vergleich diente ein mitgeführter Standard mit DNA Fragmenten bekannter Länge (DNA-Längenstandard VIII).

Nach Aufkochen der Agarose mit Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer) wurde das Gemisch unter 50 °C abgekühlt und in eine Flachbett-Horizontal-Elektrophorese-Apparatur gegossen. 8 µl der zu analysierenden DNA wurden mit 4 µl Probenauftragspuffer vermischt. Nach Erstarren des Gels konnten die Proben und der Längenstandard aufgetragen und bei 150 -180 Volt für ca. 60 min aufgetrennt werden. Dann wurde das Gel 45 min lang in einem Ethidiumbromidbad (1µg Ethidiumbromid / ml) gefärbt. Durch UV-Licht wurde das Ethidiumbromid angeregt und so die DNA-Fragmente beurteilt und fotografiert.

II.5. DNA Sequenz-Alignment

Als Basis für die Entwicklung der folgenden PCR-Methoden diente ein DNA Sequenz-Alignment aus 51 *ospA*-Sequenzen, erstellt mit Hilfe der GCG Sequenzanalyse Software (Vers. 7.0) (Devereux et al. 1984). 17 *ospA*-Sequenzen stammten aus der lokalen Datenbank des Max v. Pettekofer Instituts und 34 waren veröffentlichte *ospA*-Sequenzen. Die Spezies *B. burgdorferi* s.s. war dabei durch 14, *B. afzelii* durch 11, *B. valaisiana* durch vier, *B. lusitaniae* durch zwei Sequenzen, *B. bissettii* und *B. andersonii* jeweils durch eine Sequenz repräsentiert. Von der Spezies *B. garinii* kamen insgesamt 16 Sequenzen zur Verwendung, wobei jeder *OspA*-Typ von *B. garinii* mindestens durch zwei Sequenzen repräsentiert war. Die Sequenz des genotypisch neuen Stammes *Borrelia* A14S [197] wurde ebenfalls hinzugefügt.

II.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

II.6.1. Prinzip

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde 1986 von Kary Mullis [114] erstmals beschrieben und 1988 von Saiki vereinfacht [165]. Diese *in vitro*-Technik erlaubt die enzymatische Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts, eingerahmt von zwei bekannten Primerzielsequenzen. Die Amplifikationszyklen bestehen aus drei Phasen: Zuerst wird die doppelsträngige Matrizen-DNA bei etwa 94 °C denaturiert (Denaturierungsphase). Nach Abkühlung auf die Annealing-Temperatur können sich die Primer (Oligonukleotide) an den jeweils komplementären Strang der Matrizen-DNA anlagern (Annealingphase). Anschließend werden die Primer bei 72 °C von ihrem 3' Ende aus entsprechend dem Komplementärstrang mit einer DNA Polymerase verlängert und so die Matrizen-DNA amplifiziert (Elongationsphase). Im folgenden Zyklus wird die neusynthetisierte, doppelsträngige DNA durch die Denaturierung wieder getrennt und steht neben der Ausgangs-DNA als Matrize zur Verfügung. In der Regel wiederholt man die Amplifikationszyklen zwischen 25 und 35 Mal, was im Idealfall zu einem exponentiellen Anstieg der DNA-Fragmente führt. Die Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen (z. B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) ermöglicht eine Automatisierung der zyklischen Amplifikation, da man die Enzymlösung nicht nach jedem Schritt ersetzen muss [165].

Bei der hier durchgeführten PCR handelt es sich um eine ‚semi-nested‘ PCR. Nach einer ersten Primäramplifikation wird dabei ein Teil des Amplifikats in einem zweiten PCR-Ansatz nochmals amplifiziert. Ein Primer dieser zweiten PCR wird von der ersten Runde übernommen, der zweite Primer hybridisiert innerhalb des von der ersten PCR abgesteckten

Abschnitts. Die semi-nested bzw. nested-PCR steigert die Sensitivität und Spezifität der DNA-Vervielfältigung erheblich [119]. Nachteil der Methode ist allerdings die hohe Anfälligkeit für Verunreinigungen, vor allem beim Übertrag des Amplifikats von der ersten in die zweite Runde.

II.6.2. Qualitäts- und Kontaminationskontrolle

Die hohe Sensitivität der PCR bedingt eine große Kontaminationsgefahr. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden folgende Sicherheitsaspekte [93] beachtet:

- (1) Die DNA-Präparation, die Durchführung der PCR und die Erstellung des Mastermix PCR Ansatzes erfolgten räumlich getrennt. Letzterer wurde in einem gesonderten Raum mit Schleuse, Überdruck und nur dort verwendeten Pipetten angesetzt.
- (2) Die Pipettierung der DNA erfolgte auf einer sterilen Werkbank und mit gestopfte Pipetten.
- (3) Bei Präparation und Amplifikation von verschiedenen DNA-Proben wurden die Einmalhandschuhe gewechselt.
- (4) Die Arbeitsplätze wurden über Nacht mit UV-Licht bestrahlt, um Rest-DNA zu zerstören.
- (5) Zur Minimierung falsch-positiver Befunde wurden bei allen Tests Negativkontrollen mitgeführt. Diese bestanden aus sterilem aqua dest., welches exakt die selben Arbeitsschritte durchlief wie die eigentlichen Proben. Des Weiteren wurde bei jedem Testdurchlauf mindestens eine Positivkontrolle mitgeführt.

II.6.3. Primerauswahl

Um möglichst viele *Borrelia* Spezies gleichermaßen zu erfassen, war es zweckmäßig, konservierte Regionen des *ospA*-Gens für das Annealing der Primer auszuwählen. Um einen nachfolgenden Restriktionsenzymverdau zu ermöglichen, wurden die Primer so ausgewählt, dass das resultierende Amplifikat die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen enthielt. Für das Erzielen eines optimalen PCR Ergebnisses müssen forward- und reverse-Primer in ihrer Schmelztemperatur (T_m) möglichst übereinstimmen. Die T_m der Primer ergibt sich aus ihrer Länge und ihrem GC-Gehalt und kann nach verschiedenen Formeln berechnet werden (z. B. nach der sogenannten GC-Regel nach Suggs et al.[189]: $(\text{Anzahl von A+T}) \times 2 \text{ }^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 3 \text{ }^\circ\text{C}$). Anhand des DNA-Sequenz-Alignments ließen sich die Primer V3a, V3b und R37 neu erstellen und die Primer V1a, V1b, V2a, V2b und R1 aus vorhandenen Protokollen [191] evaluieren (Tab. 2.2.).

Als Vorwärtsprimer (forward) wurden jeweils sogenannte Wobble Primer eingesetzt (z. B. V1a, V1b), also Primerpaare, welche sich in ihrer Sequenz um jeweils eine oder mehrere

Basen unterscheiden. Der Basenaustausch ermöglicht es, ein breiteres Spektrum an *Borrelia* Spezies zu erfassen. Als reverse-Primer wurden für die Primäramplifikation und die semi-nested-PCR die Primer R1 und R37 verwendet. Beide Primer liegen zum Teil außerhalb des *ospA*-Gens in der intergenetischen Region zwischen dem *ospA*-Gen und dem *ospB*-Gen.

Tab. 2.2.: Sequenzen und Positionen der in der PCR verwendeten Primer.

Primer	PCR-Runde	Sequenzen	Position
V1a (forward)	Primäramplifikation	5'- GGG ^A ATAGGTCTAATATTAGC -3'	18 - 38
V1b (forward)	Primäramplifikation	5'- GGG ^G ATAGGTCTAATATTAGC -3'	18 - 38
V2a (forward)	semi-nested-PCR	5'- TTCAGTAGATTT ^C CCTGGTG -3'	98 - 118
V2b (forward)	semi-nested-PCR	5'- TTCAGTAGATTT ^A CCTGGTG -3'	98 - 118
V3a (forward)	semi-nested-PCR	5'- GCCTTAATAGCATG ^T AAGC -3'	37 - 55
V3b (forward)	semi-nested-PCR	5'- GCCTTAATAGCATG ^C AAGC -3'	37 - 55
R1 (reverse)	beide PCR-Runden	5'- CATAAATTCTCCTTATTTTAAAGC -3'	832 - 855
R37 (reverse)	beide PCR-Runden	5'- CTTATTTTAAAGCGGC -3'	829 - 845

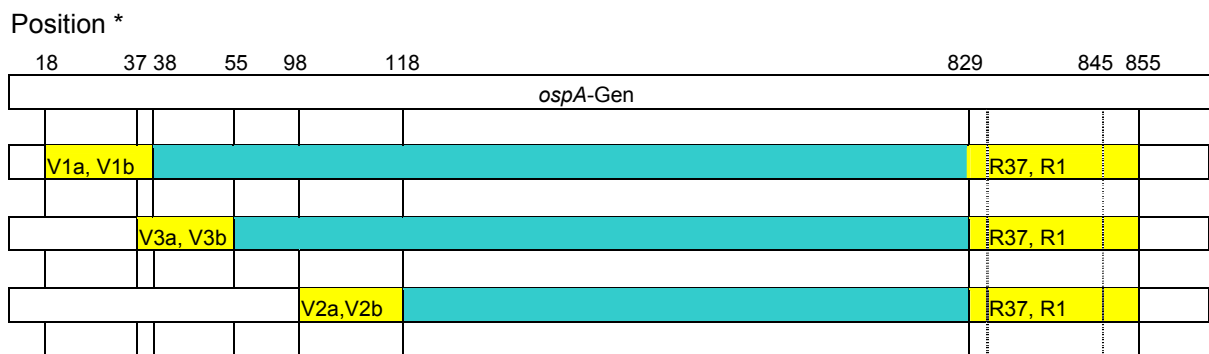


Abb. 2.1.: Verteilung der Bindungsstellen der verwendeten Primer über dem *ospA*-Gen von *B. burgdorferi* s.l.. * Position nach Konsensussequenz im DNA-Sequenzalignment.

II.6.4. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Alle Versuche zur Optimierung der Reaktionsansätze und -bedingungen wurden je zwei mal in getrennten Versuchsläufen durchgeführt.

Reaktionsansätze:

Im Rahmen der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden $MgCl_2$ -Konzentrationen zwischen 1,5 mM und 2,1 mM getestet. In der Regel ist eine $MgCl_2$ -Konzentration um 1,5 mM optimal, manchmal kann jedoch durch Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration die Sensitivität verbessert werden [119]. Die Menge der eingesetzten Primer wurde für die

Primärampifikation zwischen 5 pmol und 25 pmol und für die semi-nested-PCR zwischen 25 pmol und 50 pmol variiert (Tab. 2.3.; Tab. 2.4.) (Standard für single-run PCR 50 pmol [119]).

Reaktionsbedingungen:

Die reale T_m eines Primers kann sich von der errechneten T_m um bis zu 12 °C unterscheiden [159]. Um die optimale Annealing Temperatur der verwendeten Primer zu ermitteln, wurde diese mit Hilfe eines Gradientencyclers im Bereich von 45 °C bis 56,9 °C variiert. Die Anzahl der Zyklen wurde zwischen 30 und 40 variiert. Mehr als 40 Zyklen sind bei einer PCR nicht ratsam, da keine Verbesserung des Ergebnisses mehr zu erwarten ist, jedoch die Zahl der Artefakte zunimmt [119]. Die Dauer der Elongationsphase lässt sich bei einer definierten Aktivität der verwendeten DNA-Polymerase (ca. 25 Basen pro Sekunde) durch die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments bestimmen. Bei einer Fragmentlänge von ca. 800 Basen ergibt sich demnach eine Elongationsdauer von 32 sek. Für eine optimale Ausbeute wurde eine Dauer von einer Minute gewählt. In Tabelle 2.5. sind die getesteten Reaktionsbedingungen für die Primärampifikation bzw. die semi-nested-PCR aufgeführt. Da eine Hot-Start-DNA-Polymerase verwendet wurde, musste die initiale Denaturierungsphase mit 95 °C für mindestens 5 min durchgeführt werden, denn sie dient nicht nur der Denaturierung der DNA, sondern auch der Aktivierung der DNA-Polymerase.

Tab. 2.3.: Reaktionsansätze für die Primärampifikation

Substanz	Volumen	Menge / PCR Ansatz
10 x Puffer	5 µl	75 nmol
MgCl ₂ (25 mM)	0 – 1,2 µl	0 – 30 nmol
dNTP's	8 µl	40 nmol
Primer V1a (10 – 50 µM)	0,5 µl	5 – 25 pmol
Primer V1b (10 – 50 µM)	0,5 µl	5 – 25 pmol
Primer R1 (10 – 50 µM)	0,5 µl	5 – 25pmol
Primer R37 (10 – 50 µM)	0,5 µl	5 – 25 pmol
Hot Start Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 U
Aqua dest.	29,75 µl	
Probe	5 µl	
Endvolumen	50 µl	

Tab. 2.4. Reaktionsansätze für die semi-nested-PCR

Substanz	Volumen	Menge / PCR Ansatz
10 x Puffer	5 µl	75 nmol
MgCl ₂ (25 mM)	0 – 1,2 µl	0 – 30 nmol
dNTP's	8 µl	40 nmol
Primer V3a (50 – 100 µM)	0,5 µl	25 - 50 pmol
Primer V3b (50 - 100 µM)	0,5 µl	25 - 50 pmol
Primer R1 (50 - 100 µM)	0,5 µl	25 - 50 pmol
Primer R37 (50 - 100 µM)	0,5 µl	25 - 50 pmol
Hot Start Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 U
Aqua dest.	29,75 µl	
Primäramplifikat	5 µl	
Endvolumen	50 µl	

Tab. 2.5.: Reaktionsbedingungen für Primäramplifikation und semi-nested-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Reaktionsdauer
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
2. Denaturierung*	94 °C	45 sec
3. Annealing*	45 – 56,9 °C	45 sec
4. Elongation*	72 °C	1 min
5. Finale Elongation	72 °C	7 min

* um die optimale Zyklenanzahl zu bestimmen wurde diese zwischen 30 und 40 variiert.

II.6.5. Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung

Um die Sensitivität der PCR zu bestimmen, wurden 1 / 10 Verdünnungsreihen (siehe Kap. II.3.4.) von 10^7 bis 10^3 , sowie 2×10^2 und 2×10^1 Borrelien / ml (entspricht 5×10^4 bis 5, 1, und 0,1 Borrelien / PCR Ansatz) getestet. Die Sensitivität wurde zweimal, jeweils für *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *Borrelia* A14S und alle 5 OspA-Typen von *B. garinii* mit definierten Stämmen bestimmt (Tab 2.6.).

Um die Spezifität der PCR zu ermitteln, wurde diese mit Rückfallfieberborrelien, *Treponema* spp. und *Leptospira* spp. aus der Stammsammlung des Max v- Pettenkofer Instituts (Tab. 2.7.) in einer Konzentration von 10^7 Spirochäten / ml zweimal getestet.

Tab 2.6.: Referenz der für die Sensitivitätstestung verwendeten Stämme.

Stamm	Borrelien-Spezies	OspA-Typ	Referenz	bereitgestellt von
PKa2	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
PKo	<i>B. afzelii</i>	2	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
PBr	<i>B. garinii</i>	3	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
PBi	<i>B. garinii</i>	4	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
PHei	<i>B. garinii</i>	5	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
TN	<i>B. garinii</i>	6	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
T25	<i>B. garinii</i>	7	Wilske et al. 93	Max v. Pettenkofer Institut
VS116	<i>B. valaisiana</i>		Wang et al. 2000	G. Baranton, Paris
Poti B2	<i>B. lusitaniae</i>		Godfroid et al.	G. Baranton, Paris
PSig	<i>Borrelia</i> A14S		Wilske et al. 2002	Max v. Pettenkofer Institut

Tab 2.7.: Für die Spezifitätsanalyse getesteten *Borrelia*, *Leptospira* und *Treponema* spp..

<i>Borrelia</i> spp.	<i>Leptospira</i> spp.	<i>Treponema</i> spp.
<i>B. duttoni</i>	<i>L. pomona</i>	<i>T. phagedenis</i>
<i>B. litoralis</i>	<i>L. hardjō</i>	<i>T. denticola</i>
<i>B. anserina</i>	<i>L. copenhageni</i>	
<i>B. japonica</i> *	<i>L. tarasona</i>	
<i>B. parkeri</i>	<i>L. bratislava</i>	
<i>B. tillae</i>	<i>L. sejro</i>	
<i>B. turicatae</i>	<i>L. saxköbing</i>	
<i>B. reccurentis</i>	<i>L. australis</i>	

* japanischer Stamm, wird zum *B. burgdorferi* sensu lato Komplex gerechnet [90]

II.7. Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA an Regionen mit einer kurzen, definierten Basenfolge. Durch unterschiedliche Verteilung der Schnittstellen können sich beim Verdau der DNA von unterschiedlichen Organismen verschiedene Schnittmuster ergeben, anhand derer sich die DNA charakterisieren und unterscheiden lässt. Dies nennt man **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)**. Je nach Konservierungsgrad des verwendeten Gens ist es mit dieser Methode möglich, entfernt aber auch eng verwandte Organismen zu differenzieren und zu klassifizieren (z. B. Epidemiestämme von MRSA [47]).

Ziel bei der Entwicklung des Verdau war die Charakterisierung und Differenzierung der Spezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und der 5 OspA-Typen der Spezies *B. garinii* anhand charakteristischer Restriktionsschnittmuster.

Zur Differenzierung der Borrelien wurden die Enzyme *HindIII*, *BglIII*, *Kpn21*, *SspI* und *SfuI* verwendet (die Enzyme *SspI*, *SfuI*, *BglIII* und *Kpn21* stammten aus vorhandenen Protokollen

[191]). Jeder zu unterscheidende Subtyp besitzt im *ospA*-Gen individuelle Schnittstellen für eines oder mehrere der Enzyme. Die Schnittstellen ließen sich durch eine Restriktionsenzym-Analyse des DNA Sequenz-Alignments mit dem Softwareprogramm DNA-Man (DNA MAN Version 4.0, Lynnon Biosoft 1994) ermitteln. Die charakteristischen Schnittsequenzen der verwendeten Enzyme zeigt Tab. 2.8., die Schnittmuster der einzelnen *Borrelia*-Typen Tabelle 2.10..

Aufgrund von gering unterschiedlichen Gesamtlängen der PCR-Amplifikate der einzelnen Subtypen ergeben sich geringe Unterschiede in den Längen der DNA-Fragmente nach Restriktionsenzymverdau, auch wenn die Schnittstellen am ‚selben‘ Ort im Gen liegen. Die Ursache findet sich in einzelnen Deletionen von Basentriplets bei den entsprechenden Subtypen.

Für die Restriktionsanalyse wurden je 7 µl des Produkts der semi-nested-PCR (Kap. 2.6.) in fünf Restriktionsansätzen verdaut. Dies ermöglichte die getrennte Beurteilung der Schnittmuster der einzelnen Enzyme. Die Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen finden sich in Tabelle 2.9.

Tab. 2.8.: Die verwendeten Enzyme spalten spezifisch an den aufgeführten Basenabfolgen.

Enzym	<i>Sspl</i>	<i>BglII</i>	<i>Sful</i>	<i>Kpn21</i>	<i>HindIII</i>
Schnittstelle	AA TATT	A GATCT	TT CGAA	T CCGGA	A AGCTT
5' → 3'	↑	↑	↑	↑	↑

↑ markiert die Schnittstellen der Restriktionsenzyme

Tab 2.9.: Die Tabelle zeigt den Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen für den Restriktionsenzymverdau.

Reaktionsansatz:		Reaktionsbedingungen:	
Puffer (Enzymspezifisch*)	2 µl	<i>Sspl</i>	37 °C
Enzym (<i>Sspl</i> , <i>Sful</i> , <i>BglII</i> , <i>Kpn21</i> , <i>HindIII</i>)	0,5 µl	<i>Sful</i>	37 °C
Aqua dest.	10,5 µl	<i>BglII</i>	37 °C
Amplifikat	7 µl	<i>Kpn21</i>	37 °C
Gesamtmenge:	20 µl	<i>HindIII</i>	55 °C

* Enzymspezifischer Puffer: cut buffer H (*SspI* und *Sful*), cut buffer M (*BglII*), Y⁺ Puffer (*Kpn21*) und sure cut puffer B (*HindIII*).

Tab. 2.10.: Theoretische Länge der DNA-Fragmente, die sich nach DNA-Sequenzalignment im Restriktionsenzymverdau des PCR-Produkts ergeben.

Stämme	NCBI Accession No.	Species	Theoretisches RFLP-Muster						
			Ospa -Typ	SspI	SfuI	BglII	Kpn21	HindIII	
PKa2 ¹ , PBr ^{e1} CA8 ³	X80182, X85739	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	534/264	798	798	798	798	654/144
	L23144	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	534/264	798	798	798	429/369	654/144
PKo ¹ , PLud ¹	S48322, X85439	<i>B. afzelii</i>	2	798	537/261	798	798	798	798
PBr ¹	X80256	<i>B. garinii</i>	3	791	791	758/33	429/362	791	791
PBi ¹ , PTrob ¹	S48323, -	<i>B. garinii</i>	4	798	798	556/242	798	798	798
PHei ¹	X80251	<i>B. garinii</i>	5	798	798	798	549/195/54	654/144	654/144
TN ¹ , PWudII ¹	X80252, X80253	<i>B. garinii</i>	6	801	801	801	429/252/120	657/144	657/144
T25 ¹	X80254	<i>B. garinii</i>	7	791	791	758/33	429/185/177	585/144/62	585/144/62
PRef ¹	X95362	<i>B. garinii</i>	7	791	791	758/33	429/362	647/144	647/144
VS116 ²	AF095940	<i>B. valaisiana</i>	-	801	801	801	801	801	465/336
M53 ²	AF095947	<i>B. valaisiana</i>	-	798	798	665/133	798	798	654/144
PotIB2	Y10838	<i>B. lusitanae</i>	-	466/341	807	807	807	807	402/284/72/49
PotIB3	Y10839	<i>B. lusitanae</i>	-	466/341	807	807	807	807	402/356/49
A14S ⁴	AF102057	<i>Borrelia</i> A14S	-	798	798	665/133	798	798	654/144

¹[215], ²[198], ³[39], ⁴[197]

Die Ansätze wurden mindestens zwölf Stunden bei der entsprechenden Temperatur inkubiert (37 °C im Brutschrank, 55 °C im Thermoblock), um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten. Durch Verwendung von gestopften Pipetten und das Arbeiten an einer Sterilwerkbank ließ sich eine unspezifischer Endonukleaseaktivität über diese lange Zeit minimieren.

II.8. DNA Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruch- oder Didesoxymethode von Sanger et al., [167]. Dabei verwendet man basenspezifisch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (Dye Terminatoren). Diese werden zufällig neben den Desoxynukleotiden in der Elongationsphase der Sequenzreaktion in das Amplifikationsprodukt eingebaut. Dies markiert die entstandenen DNA Fragmente mit dem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff und bricht simultan die DNA Kettensynthese ab. Nach Ethanol fällung und Auftrennung der Fragmente mittels Kapillarelektrophorese lässt sich deren Länge und terminale Base lasergestützt ablesen und so die Basenabfolge der eingesetzten Matrizen-DNA ermitteln.

Die Aufreinigung des PCR-Produkts für die Sequenzierung erfolgte mit dem ‚High pure PCR product purification kit‘ nach Anweisungen des Herstellers. Die Menge der aufgereinigten DNA wurde durch Gelelektrophorese und Vergleich mit einem bekannten Standard (DNA-Längenstandard VIII) abgeschätzt. Ca. 100 ng aufgereinigte DNA (1 – 3 µl), 1 µl (5 pmol) Primer V3a, V3b, oder R1 und 4 µl Big Dye ABI PRISM (enthält Dye Terminatoren, dNTP's Amplitaq DNA Polymerase, MgCl₂, Puffer) wurden mit Aqua dest. auf 20 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler in 25 Zyklen amplifiziert. Ein Zyklus bestand je aus Denaturierungsphase (96 °C für 10 s), Annealingphase (48 °C für 5 s) und Elongationsphase (60 °C für 4 min) mit statistischem Kettenabbruch durch Einbau der fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nucleotide.

Es folgte eine Ethanol fällung der markierten DNA-Fragmente. Der gecyclte Reaktionsansatz wurde mit 50 µl 96-prozentigem Ethanol und 2 µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,2) vermischt. Nach 10 min Fällung bei Raumtemperatur wurde das Gemisch 20 min bei 14000 U / min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 200 µl 70 % Ethanol, erneutem Zentrifugieren (10 min bei 14000 U / min) und Verwerfen des Überstands wurde das Pellet im Thermoblock bei 50 °C getrocknet.

Die Analyse der aufbereiteten DNA-Fragmente erfolgte nach Resuspension in ‚Template Supression Reagent ABI PRISM‘ in einem Sequenzierautomat. Die Technik beinhaltet die

Auftrennung der basenspezifisch fluoreszenzmarkierten Fragmente in einem hochauflösenden Sequenzgel mittels Kapillarelektrophorese. Die so entstandene Basenleiter konnte lasergestützt abgelesen und ausgewertet werden.

Bei der Auswertung der erhaltenen Basenabfolge kam das Softwareprogramm Chromas (Vers. 1.42; Connor McCarthy) , bei der Weiterverarbeitung das Programm DNA-MAN zur Anwendung.

II.9. Multiplex-PCR

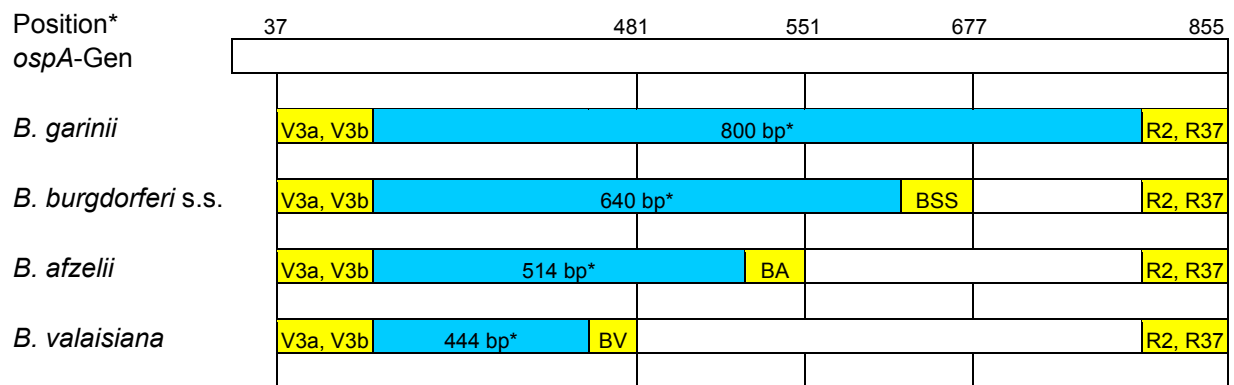
Die Multiplex-PCR wurde nach dem Konzept der semi-nested bzw. nested-PCR durchgeführt (siehe Kap. II.6.). Die Primäramplifikation erfolgte mit den gleichen Primern und Reaktionsbedingungen wie die *ospA*-PCR (Kap. II.6.4.). Für die nested-PCR wurden anhand des DNA Sequenz-Alignments Bindungsstellen für reverse-Primer ermittelt, welche einerseits möglichst spezifisch für die entsprechende *Borrelia*-Spezies (BSS für *B. burgdorferi* s.s., BA für *B. afzelii*, und BV für *B. valaisiana*) sind, andererseits unterscheiden sich die potenziell entstehenden Amplifikate in ihrer Länge deutlich genug, um sie mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese differenzieren zu können. Durch Modifikation der Basenzahl konnten die Schmelztemperaturen der Spezies-spezifischen reverse-Primer aneinander angeglichen werden. Für die Amplifikation von *B. garinii* und der anderen *B. burgdorferi* s.l.-Spezies wurden die nicht Spezies-spezifischen reverse-Primer R1 und R37 zu dem Primermix addiert. Tab 2.11 zeigt die in der nested-PCR verwendeten Primer, in Abb. 2.2. sind die jeweiligen Primerbindungsstellen im *ospA*-Gen dargestellt.

Die Reaktionsbedingungen gleichen den in Tab. 2.4. dargestellten Bedingungen der semi-nested *ospA*-PCR. Durch Zugabe dreier zusätzlicher Primer (je 0,5 µl) war allerdings bei einem Gesamtvolumen von 50 µl die zugegebene Menge von Aqua dest. auf 28,25 µl pro Ansatz zu reduzieren. Die Temperaturzyklen wurden nach dem in Tab. 2.5. aufgezeigten Schema durchgeführt.

Die Bestimmung der PCR-Sensitivität erfolgte zweimal, mit Verdünnungsreihen von 10^7 bis 10^3 , 2×10^2 und 2×10^1 Borrelien / ml (entspricht 5×10^4 bis 5, 1, und 0,1 Borrelien / PCR Ansatz), jeweils für *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und alle fünf *OspA*-Typen von *B. garinii* mit definierten Stämmen (Tab 2.6.). Zur Ermittlung der Spezifität wurden hohe Konzentrationen (10^7 / ml) von *Borrelia* spp., *Treponema* spp. und *Leptospira* spp. (Tab. 2.7.) zweimal auf eine Amplifikation mit der PCR getestet.

Tab 2.11.: Primer der Multiplex-PCR mit Sequenz und T_m .

Primer	spezifisch für	Sequenz	T_m (°C)
V3a (forward)	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'- GCCTTAATAGCATGTAAGC -3'	50,4
V3b (forward)	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'- GCCTTAATAGCATGCAAGC -3'	56,2
BSS (reverse)	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	5'- CCTGAATTCCAAGCTG -3'	50,1
BA (reverse)	<i>B. afzelii</i>	5'- AATGTTACTTTATCATTAGCTACTT -3'	50,4
BV (reverse)	<i>B. valaisiana</i>	5'- TAGCATTTTCAGCATCTG -3'	50,4
R1 (reverse)	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'- CATAAATTCTCCTTATTTTAAAGC -3'	53,2
R37 (reverse)	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'- CCTTATTTTAAAGCGGC -3'	51,2

**Abb. 2.2.:** Verteilung der Bindungsstellen der verwendeten Primer über dem *ospA*-Gen der verschiedenen *Borrelia* Spezies. * = Position und Länge nach Konsensussequenz im DNA-Sequenzalignment.

Um die Kreuzreaktivität der Spezies-spezifischen Primer BSS, BA und BV zu evaluieren, war es nötig, diese getrennt mit Borrelien der verschiedenen Spezies (*B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana*) in einer hohen Konzentration (10^7 Borrelien / ml) zu testen.

II.10. LightCycler

II.10.1. Prinzip

Der LightCycler verbindet die Konzepte der ‚rapid-cycle‘ PCR und der ‚real time‘ PCR. Bei der ‚rapid cycle‘ PCR wird die Dauer eines Amplifikationszyklus stark verkürzt. Zugrunde liegt ein kinetischer Paradigmus der PCR: Die Teilreaktionen - Annealing, Denaturation und Elongation - laufen nicht nur in den Phasen mit konstant gehaltener Temperatur (Annealingphase, Denaturationsphase, Elongationsphase) ab. Sie erfolgen zu jedem Zeitpunkt im Zyklus, je nach Temperatur mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (also auch in den Phasen des Temperaturanstiegs bzw. -abfalls). Es finden also mehrere Reaktionen

gleichzeitig statt [226]. So ist die Dauer der eigentlichen Annealing- bzw. Denaturationsphase auf wenige Sekunden reduzierbar.

Im LightCycler System findet die PCR-Reaktion in Glaskapillaren statt, welche durch Luft abgekühlt bzw. erhitzt werden. Die geringe Wärmekapazität von Luft und das hohe Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Glaskapillaren ermöglichen eine schnelle Änderung der Cycle-Temperatur. Zusammen mit der Verkürzung der einzelnen Phasen lässt sich so die Dauer der Temperaturzyklen und somit der gesamten PCR um ein Vielfaches verringern.

Der Begriff ‚real time‘ PCR bezieht sich auf ein kontinuierliches Monitoring des entstehenden PCR-Produkts während der Reaktion. Dies geschieht über die Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der PCR proportional zur Menge des entstehenden Amplifikats ansteigt. Die verwendeten optisch klaren Borosilicate-Glaskapillaren fungieren dabei als Reaktionsgefäß und als Küvette für die Fluoreszenzmessung. Die Erzeugung des Fluoreszenzsignals ist im SYBR Green-Format und im Hyb-Probes-Format möglich.

Das SYBR Green I-Dye (interkalierende Substanz) bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA. Durch diese Bindung wird es zur Fluoreszenz angeregt. Man misst also je nach Menge der doppelsträngigen DNA in der Glaskapillare ein unterschiedlich starkes Signal (bei 530 nm Wellenlänge). Während der Denaturierungs-, bzw. der Annealingphase liegt kaum doppelsträngige DNA vor; man misst also nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Am Ende der Elongationsphase liegt die meiste DNA in Doppelsträngen vor, und die maximale Menge SYBR Green ist gebunden. Dies entspricht einem maximalen Fluoreszenzsignal. Durch Messung der Fluoreszenz jeweils am Ende jeder Elongationsphase ist so die steigende Menge DNA von Zyklus zu Zyklus detektierbar.

Das Hyb-Probes-Format dient dazu, Sequenz-Spezifität bei der Detektion zu erreichen. Hierfür werden zwei sequenz-spezifische Oligonukleotide (Hyb-Probes) ausgewählt, welche an der Ziel-DNA im Abstand von einer bis wenigen Basen binden. Die beiden Oligonukleotide sind an den einander zugewandten Enden mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert - die eine mit einem Acceptor-Dye (LC Red 640), die andere mit einem Donor-Dye (Fluorescein). Wenn Donor- und Acceptor-Dye durch die Bindung der Oligonukleotide an der Ziel-DNA in unmittelbare Nähe geraten, regt die Energie des Donor-Dyes das Acceptor-Dye an. Dieses emittiert dann Fluoreszenz der Wellenlänge 640 nm. Dieser Vorgang, der auch als ‚Fluorescence resonance energy transfer‘ (FRET) bezeichnet wird, ist hochgradig abhängig von der geringen Distanz der beiden Dyes (nur 1 – 5 Nukleotide Abstand). Am Ende der Annealing Phase sind neben den Primern auch die Hyb-Probes gebunden, und eine Messung der Fluoreszenz in jedem Zyklus ermöglicht eine Detektion der ansteigenden Ziel-DNA.

In beiden Formaten kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz proportional zur entstandenen DNA-Menge. Wenn die Fluoreszenz gegen die Zeit aufgetragen wird, resultiert eine Kurve ähnlich der Wachstumskurve von Bakterien [150]. Diese Kurve beinhaltet eine initiale Lag Phase, in welcher das Signal unter der Sensitivität des Fluorimeters liegt, eine exponentielle Log Phase und eine Plateau Phase. Ein Monitoring der Fluoreszenz in jedem Zyklus kann zur Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten DNA Menge benutzt werden [227;228]. Höhere Ausgangsmengen von DNA verschieben die Kurve nach links, zu früheren Zyklen. Dieser in Zyklenanzahl fraktionierte Shift ist indirekt proportional zum Logarithmus der initialen Templatekonzentration [226]. Standardkurven, interne und externe Standards ermöglichen so durch den Vergleich der Kurven eine relative Quantifizierung des PCR-Templates.

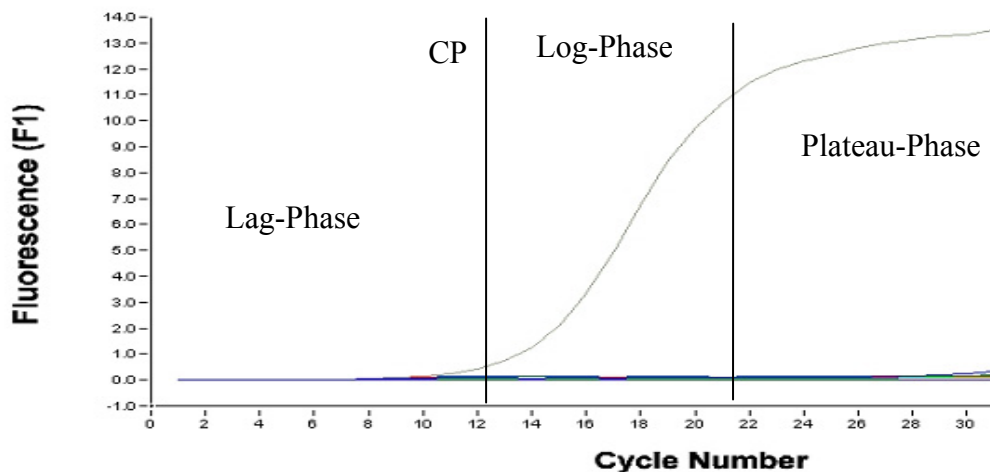


Abb. 2.3.: Beispielhafte Fluoreszenzkurve zur Darstellung von Lag-, Log- und Plateauphase. CP = Crossing Point

Eine weitere Spezifizierung des entstandenen Produkts ist nach Ablauf der PCR mit der Schmelzkurvenanalyse - langsamem Anheben der Temperatur und gleichzeitigem, kontinuierlichem Monitoring des Fluoreszenzsignals - möglich. Im SYBR Green-Format reagiert die Fluoreszenz besonders im Bereich der T_m des entstandenen Produkts empfindlich auf kleine Temperaturänderungen [226]. Wenn die negativierte Ableitung der Fluoreszenz über die Temperatur ($-d(F) / dT$) aufgetragen wird, entsteht ein Peak an der Stelle der höchsten Empfindlichkeit [28]. Die Lage dieses Peaks ist eine Funktion der Länge und des GC-Gehalts des entstandenen PCR-Produkts [158]. Sie kann also zur Spezifizierung des Templates verwendet werden. Im Hyb-Probes-Format ermöglicht eine Schmelzkurvenanalyse sogar die Detektion von einzelnen Basenmutationen, da jeder Proben-Target-Komplex eine charakteristische Temperaturstabilität besitzt, abhängig von Länge, GC-Gehalt und Watson-

Crick-pairing [168;203]. Basenmutationen verschieben diese Stabilität je nach Fehlpaarung, Position und benachbarten Basen [6-9;65;131]. So können durch eine Schmelzkurvenanalyse Basendifferenzen leicht detektiert und meist von anderen Basenaustauschen differenziert werden [26;27;94].

II.10.2. Verwendete Primer und Hyb-Probes

Im Rahmen der Optimierung der Sensitivität und Spezifität der LightCycler-PCR wurden drei verschiedene Primersets (Tab 2.12) zur Amplifikation eines Abschnitts des *ospA*-Gens getestet. Die Durchführung der LightCycler-PCR mit den Primern V3a, V3b, R1 und R37 erfolgte als Single-run und als nested-PCR. Bei der nested-PCR wurde die Primäramplifikation - wie in Kap. 2.6. beschrieben - im Block Cycler vorgenommen, und das Produkt dieser Amplifikation als Template in die LightCycler-PCR eingesetzt. Die verwendeten Hyb-Probes (Tab. 2.13., Abb. 2.4.) stellte Dr. Udo Reischl (Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Regensburg) zur Verfügung.

Tab. 2.12.: Mit dem LightCycler getestete OspA-Primersets.

Primer	Set	forward / reverse	Sequenz	Referenz
V3a	S + M	forward	5'- GCCTTAATAGCATGTAAGC -3'	diese Studie
V3b	S + M	forward	5'- GCCTTAATAGCATGCAAGC -3'	diese Studie
R1	S + M	reverse	5'- CATAAATTCTCCTTATTTTAAAGC -3'	Trebesius 2000
R37	S + M	reverse	5'- CCTTATTTTAAAGCGGC -3'	diese Studie
BSS	M	reverse	5'- CCTGAATTCCAAGCTG -3'	diese Studie
BA	M	reverse	5'- AATGTTACTTTATCATTAGCTACTT -3'	diese Studie
BV	M	reverse	5'- TAGCATTTTCAGCATCTG -3'	diese Studie
OspA2A	E	Forward	5'-CATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCC-3'	Eiffert 1995
OspA2B	E	reverse	5'-CTGTGTATTCAAGTCTGGTTCC-3'	Eiffert 1995

S = Standard; M = Multi; E = Eiffert

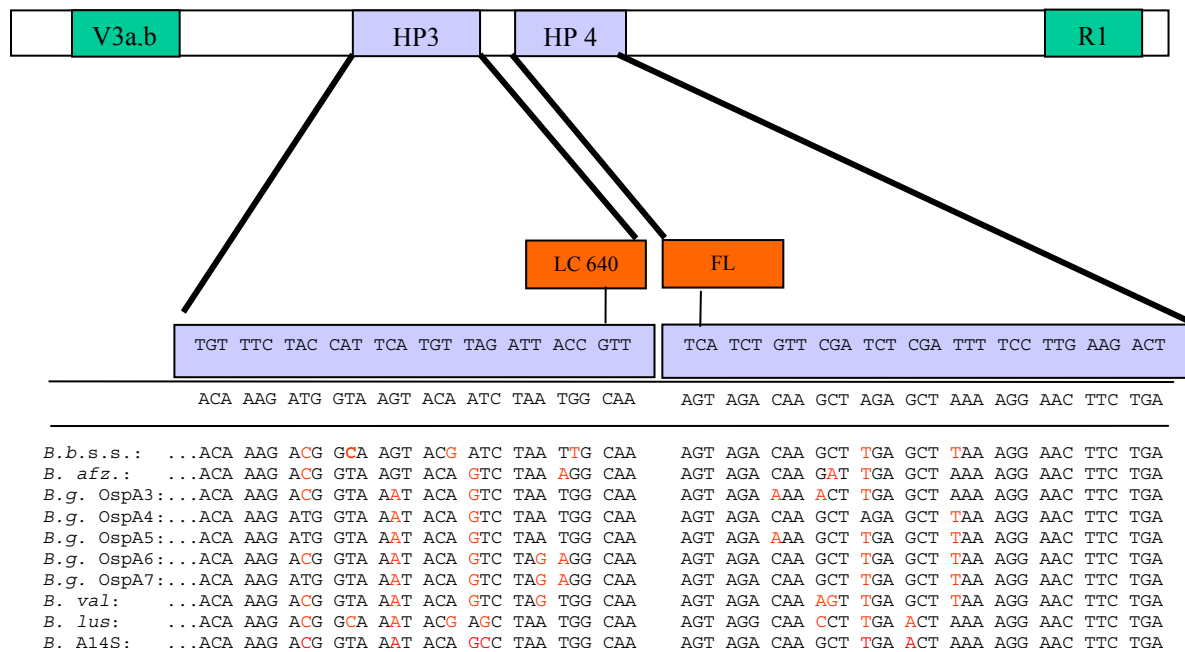


Abb. 2.4.: Graphische Darstellung der Hyb-Probes HP3 und HP4 mit komplementärer Zielsequenz und Vergleich zu den Sequenzen von *B. burgdorferi* s.s. (B.b.s.s.), *B. afzelii* (B. afz.), *B. garinii* OspA-Typ 3 bis 7 (B.g. OspA3 – 7), *B. valaisiana* (B. val), *B. lusitaniae* (B. lus) und *Borrelia* A14S. Mismatches zur Konsensussequenz sind rot markiert. LC640 = Acceptor-Dye, FL = Donor-Dye

Tab. 2.13.: Verwendete Hyb-Probes mit ihrer Sequenz.

Hyb-Probes	Zielgen	Sequenz
OspA-HP-3	<i>ospA</i>	5'-LC Red640-TTGCCATTAGATTGTA CTTACCATCTTTGT-p-3'
OspA-HP-4	<i>ospA</i>	5'-TCAGAAGTTCCTTTTAGCTCTAGCTTGTCTACT-FAM-3'

LC Red640 ist das Acceptor Dye, FAM das Donor Dye (Fluorescein). P steht für Phosphat.

II.10.3. Reaktionsbedingungen

Tab. 2.14. und Tab. 2.15. zeigen Reaktionsansätze und -bedingungen der LightCycler-PCR. Das grundsätzliche Schema stellte ebenfalls Dr. Udo Reischl zur Verfügung. Die Annealingtemperatur und die Dauer der Elongationsphase wurden je nach Primerset und Länge des Amplifikons (ca. 1s Elongation pro 25 Basen Länge) variiert. Aufgrund des kürzeren Amplifikats ergab sich für das Set ‚Eiffert‘ eine um zwei Sekunden kürzere Elongationszeit. Der Hersteller-Empfehlung gemäß (Adaption Protocol for Sequence-Specific Detection of DNA with Hybridization Probes, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) wurde die Temperatur nach der Annealingphase bei den Primersets ‚Standard‘ und ‚Multi‘ aufgrund der niedrigeren Annealingtemperatur nur mit 5 °C / sec anstatt 20 °C / sec angehoben.

Tab. 2.14.: Reaktionsbedingungen für die *ospA*-LightCycler-PCR.

Substanz	Volumen	Menge / PCR-Ansatz
je Primer (100 µM)	0,1 µl	10 pmol
MgCl ₂ (25 mM)	3,2 µl	80 nmol
je Hyb-Probes HP3, HP4 (3 µM) **	1,33 µl	4 nmol
Fast Start Kit*	2 µl	
Aqua dest. (Ansatz wird auf 17 µl aufgefüllt)	8,74–11,6 µl	
Template	3 µl	
Gesamt	20 µl	

* Je nach Format wurde das Fast-Start-Kit für SYBR Green bzw. das Fast-Start-Kit für Hyb-Probes zugegeben. Die Kits enthalten Fast Start Taq Polymerase, Puffer und Nukleotide.

** nur im Hyb-Probes Format

Tab. 2.15.: Temperaturzyklen der LightCycler-PCR mit Primern V3a, V3b, R1 und R37.

Reaktionsschritt	Temperatur	Reaktionsdauer	Temperaturänderung
1. Initiale Denaturierung	95 °C	600 sec	20 °C / sec
2. Amplifikation:			
a. Denaturierung	95 °C	10 sec	20 °C / sec
b. Annealing	48 °C (50 °C)*	20 sec	20 °C / sec
c. Elongation	72 °C	32 sec (30 sec)*	5 °C / sec (20 °C / sec)*
3. Schmelzkurve			
a. Denaturierung	95 °C	0 sec	20 °C / sec
b. Abkühlung	40 °C	10 sec	20 °C / sec
c. Schmelzkurve	95 °C	0 sec	0,1 °C / sec

* in Klammern: Bedingungen bei Verwendung der Primer *OspA2A* und *OspA2B*.

II.10.4. Auswertung

Die Messung der Fluoreszenz fand im SYBR Green-Format in Kanal F1 bei einer Wellenlänge von 530 nm statt - als einzelne Messung am Ende jeder Elongationsphase und als kontinuierliche Messung während des langsamen Temperaturanstiegs in der Schmelzkurvenanalyse. Im Hyb-Probes-Format wurde die Fluoreszenz in Kanal F2 bei einer Wellenlänge von 640 nm gemessen - als einzelne Messung der ansteigenden Fluoreszenz am Ende jeder Annealingphase und als kontinuierliche Messung während der Schmelzkurven-

analyse. Die Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit der LightCycler-Software (Roche Molecular Biochemicals Mannheim).

Zur System-unabhängigen Kontrolle der Amplifikation wurden die LightCycler-Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt. Dazu wurde das Reaktionsgemisch nach Abschluss des LightCycler-Laufs durch Zentrifugieren (5000 U / min für 10 s) aus den Glaskapillaren in ein Reaktionsgefäß transferiert, im Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung dargestellt (siehe Kap. 2.4.).

II.10.5. Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmungen

Die Sensitivität wurde sowohl im SYBR Green-, als auch Hyb-Probes-Format jeweils zweimal in getrennten Versuchsdurchläufen evaluiert. Getestet wurden DNA-Verdünnungsreihen zwischen 10^7 und 2×10^2 Borrelien / ml. Im SYBR Green-Format wurde je ein Stamm der Spezies *B. burgdorferi* s.s. (PKa2), *B. afzelii* (PKo), *B. valaisiana* (VS116) und *B. garinii* (PBi) getestet. Aufgrund der stärkeren Sequenzabhängigkeit der Detektion im Hyb-Probes-Verfahren wurden hier zusätzlich zu den obigen Stämmen noch die anderen OspA-Typen von *B. garinii* (PBr, PHei, TN und T25) getestet.

Zur Bestimmung der Spezifität wurden 7 Rückfallfieberborrelien., 1 *Treponema* spp. und 2 *Leptospira* spp. im Hyb-Probes-Format und 1 *Treponema* spp. und 6 *Leptospira* spp. im SYBR Green-Format, jeweils in hohen Konzentrationen 10^7 Sprochäten / ml getestet (Tab. 2.7.).

II.11. Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Fisher-exact-Test und der Chi-Quadrat Test mit dem Softwareprogramm Epi Info, Version 6 [43], der t-Test mit Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporations) durchgeführt.

II.12. Materialien

II.12.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Waage:	MC1 Laboratory LC 220S (Sartorius, Göttingen)
Vortex:	Reax 2000 (Heidolph, Schwabach)
Heizblock:	Liebisch (Bielefeld)
Rührplatte:	IKAMAG RCT (IKA-Labortechnik, Staufen)
Inkubationskammern:	Brutschrank Typ A (Melag AG, Berlin)

Brutschrank Kultur:	Function line (Kendro Laboratory Products, Hanau)
Mikroskop:	Dialux 22 (Leitz, Stuttgart)
Gelkammer:	Gator Breitformat-Gelsystem Modell A3 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Transformator:	Power Oac 200 (Bio Rad, München)
Pipetten:	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Pipetman (Gilson, France)
Gel-Dokumentationssystem	(Herolab, Wiesloch)
Zentrifugen:	Centrifuge 5417C (Eppendorf, Engelsdorf) Centrifuge 5414C (Eppendorf, Engelsdorf) Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge (Sorvall) LC Carousel Centrifuge, (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Cycler:	Gene Amp PCR-System 2700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
Sequenzierautomat:	ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt)
Objektträger:	76mm x 26mm (Langenbrinck, Emmendingen)
Pipettenspitzen:	Safe-Seal-Tips 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Biozym, Diagnostik GmbH Oldendorf)
PCR Tubes:	PCR Tubes mit Flachdeckel, 200 µl (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf)
LightCycler Capillaries:	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

II.12.2. Kulturmedien

MKP- Medium: Grundmedium:	100 ml CMRL-1066 (Gibco BRL, Eggenstein)
	3 g Neopepton (Difco, Augsburg)
	6 g Hepes (Sigma, Deisenhofen)
	0,7 g Natriumcitrat (Sigma, Deisenhofen)
	5 g Glucose (Sigma, Deisenhofen)
	0,8 g Natriumpyruvat (Sigma, Deisenhofen)
	0,4 g N-Acetylglucosamin (Sigma, Deisenhofen)
	2 g Natriumbicarbonat (Sigma, Deisenhofen)
	mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt

Anreicherungszusätze (zu 1600 ml Grundmedium):

200 ml 7 %ige Gelatine (Merck, Darmstadt)

100 ml Kaninchenserum, steril, partiell hämolysiert
(Gibco BRL, Eggenstein)

100 ml 35 %iges Rinderserumalbumin (Sigma,
Deisenhofen)

II.12.3. Enzyme

Hot Start Taq Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt)

SspI (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

SfiI (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

BglII (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Kpn21 (MBI Fermentans, Lithuania)

HindIII (Invitrogen, Karlsruhe)

II.12.4. Lösungen, Puffer, Reagenzien, Kits

High-Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

High Pure PCR Produkt Purifikation Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Sure Cut Buffer H (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Sure Cut Buffer M (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

Buffer Y⁺ / Tango (MBI Fermentans, Lithuania)

10 x PCR buffer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

dATP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

dCTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

dGTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

dTTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)

MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Primer V1a, V1b, V2a, V2b, V3a, V3b, R1, R37, BSS, BA, BV, OspA2A, OspA2B
(Metabion, Martinsried)

Hyb-Probes HP3 und HP4 (TIB Molbiol, Berlin)

LightCycler-Fast-Start DNA Master, Hybridization Probes (Roche Molecular Biochemicals,
Mannheim)

LightCycler-Fast-Start DNA Master, SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals,
Mannheim)

III. Ergebnisse

III.1. Entwicklung der *ospA*-PCR

III.1.1. Auswahl der Primer

Ziel war die Entwicklung einer *ospA*-PCR zum sensitiven Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. für diagnostische und epidemiologische Zwecke mit möglichst sensitiver Erfassung der Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* und des neu beschriebenen Stammes *Borrelia* A14S [197]. Weiterhin sollte eine gleichmäßige und sensitive Detektion für alle fünf OspA-Typen von *B. garinii* einzeln erreicht werden. Ausgangspunkt für die Entwicklung war das Protokoll von Trebesius et al. [191] für eine semi-nested-PCR zur Amplifikation und Differenzierung von Borrelien aus Kulturmaterial.

Zunächst wurden die Zielsequenzen der vorhandenen Primer mit einem DNA Sequenz-Alignment aus 51 kompletten *ospA* Sequenzen verglichen. Dabei zeigte sich eine gute Erfassung der gewünschten *Borrelia*-Spezies durch die in der Primäramplifikation verwendeten forward-Primer V1a und V1b. Bei den forward-Primern der semi-nested Amplifikation V2a und V2b ergab die Analyse fünf Mismatches mit *B. lusitaniae* und je zwei Mismatches mit *B. valaisiana* und *Borrelia* A14S. Um eine sensitivere Erfassung dieser Spezies zu erreichen, wurden für die semi-nested Amplifikation die forward-Primer V3a und V3b entworfen (Abb. 3.1.). In einem Vortest wurden die Primer V2a / V2b und V3a / V3b verglichen. Dazu wurden Verdünnungsreihen von Stämmen der verschiedenen *Borrelia*-Spezies und aller OspA-Typen parallel getestet (Tab. 2.6.). Es ergab sich eine vergleichbare Sensitivität für alle getesteten Stämme bis auf VS116 (*B. valaisiana*) und PotiB2 (*B. lusitaniae*). Hier war die Sensitivität der Primer V3a / V3b im Vergleich zu den Primern V2a / V2b für *B. valaisiana* um eine Zehnerpotenz, für *B. lusitaniae* um zwei Zehnerpotenzen höher.

Die Annealing-Stelle für den reverse-Primer R1 beider Amplifikationsrunden befindet sich zum Teil in der intergenetischen Region zwischen dem *ospA*-Gen und dem *ospB*-Gen. Für diesen Bereich stand weniger Sequenzmaterial zur Verfügung, insbesondere zur Beurteilung von R1 in Bezug auf die im *ospA*-Gen heterogene Spezies *B. garinii*. Die Vortestungen ergaben für beide Primersysteme (V2a / V2b, V3a / V3b) eine deutlich geringere Sensitivität für die Stämme PBr (*B. garinii* OspA-Typ 3) und T25 (*B. garinii* OspA-Typ 7). Anhand des DNA-Sequenz-Alignments wurde für diese Stämme ein zusätzlicher reverse-Primer (R37) entworfen, welcher im Vergleich zu R1 um drei Basen in Richtung *ospA*-Gen verschoben liegt (Abb. 3.2.). Der zusätzliche Einsatz von R37 ergab in der Austestung mit Verdünnungsreihen eine Steigerung der Sensitivität um zwei bis drei Zehnerpotenzen für PBr

und um zwei Zehnerpotenzen für T25. In den folgenden Experimenten wurde die optimierte Primerkombination V1a, V1b, R1 und R37 in der Primäramplifikation und V3a, V3b, R1 und R37 in der nested Amplifikation verwendet.

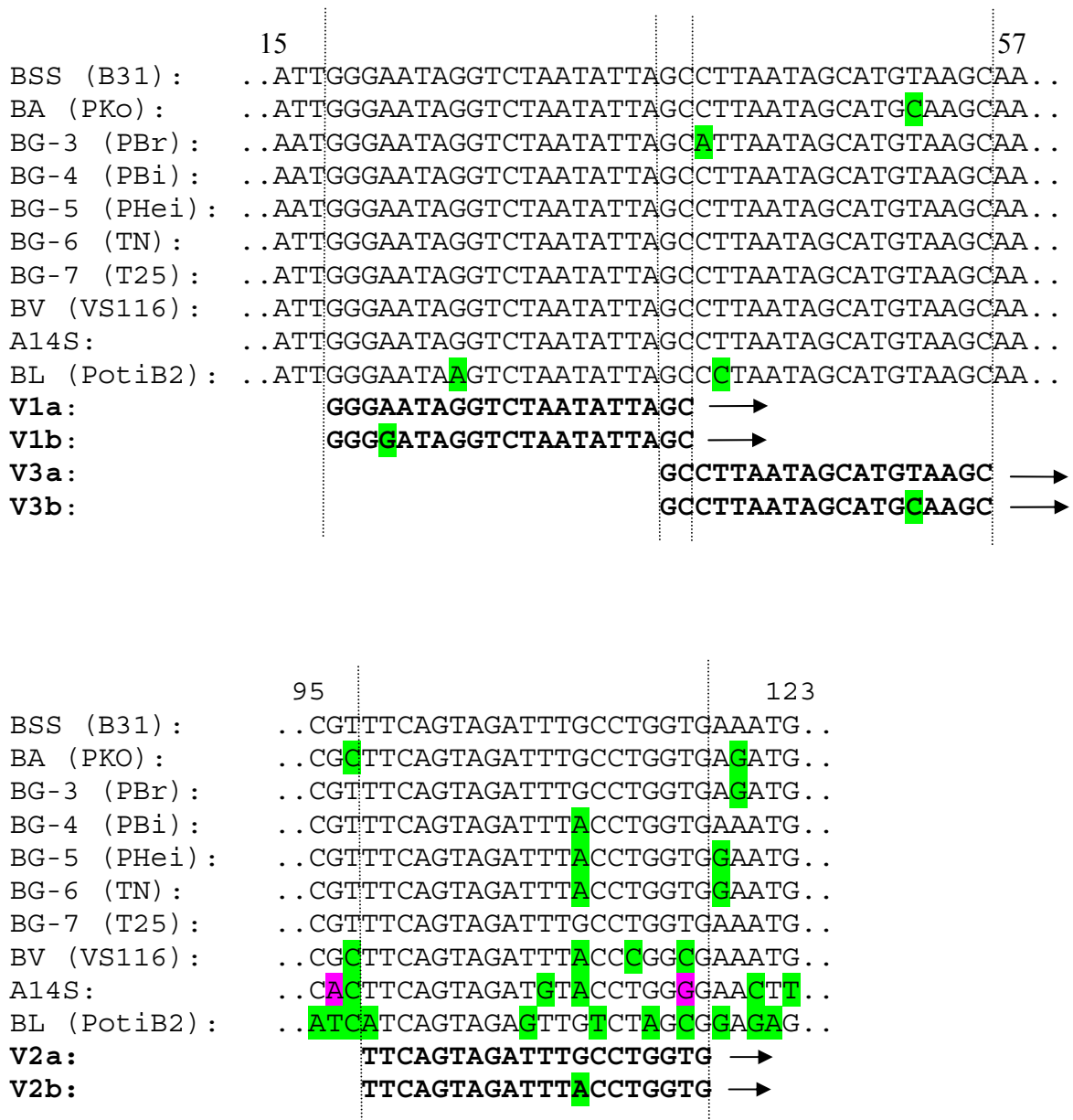


Abb. 3.1.: Ausschnitte aus dem Sequenz-Alignment mit Bindungsstellen der Primer V1a, V1b, V2a, V2b, V3a, V3b. Die Stämme (in Klammern) stehen stellvertretend für die Spezies *B. burgdorferi* s.s. (BSS), *B. afzelii* (BA), *B. valaisiana* (BV), *B. lusitaniae* (BL), *Borrelia* A14S und die fünf OspA-Typen von *B. garinii* (BG-3 bis 7). Der Pfeil markiert die Elongationsrichtung (→). Abweichungen von der Konsensussequenz sind grün und rot hervorgehoben.

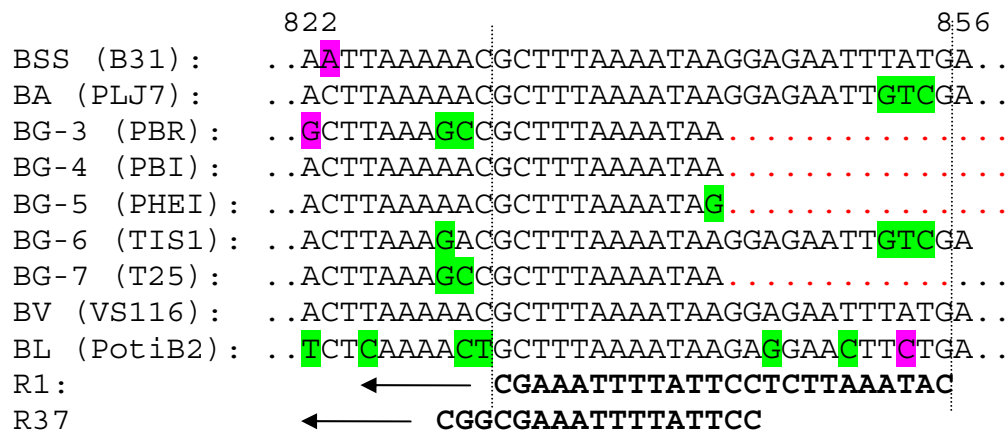


Abb. 3.2.: Ende des *ospA*-Gens und Teile der intergenetischen Region zwischen dem *ospA*- und dem *ospB*-Gen mit den reverse-Primern R1 und R37. Die Stämme (in Klammern) stehen stellvertretend für die verschiedenen Spezies *B. burgdorferi* s.s. (BSS), *B. afzelii* (BA), *B. valaisiana* (BV), *B. lusitaniae* (BL) und die fünf OspA-Typen von *B. garinii* (BG-3 bis 7). Die Elongationsrichtung ist durch einen Pfeil markiert (→). Abweichungen von der Konsensussequenz sind grün und rot hervorgehoben. Rote Punkte entsprechen unbekanntem Sequenzabschnitten

III.1.2. Optimierung der Reaktionsansätze

Hauptkriterium bei der Optimierung der Reaktionsansätze war die Sensitivität. Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden mit denselben Verdünnungsreihen von ausgezählten Borrelienzstämmen des Max von Pettenkofer-Instituts (Tab. 2.6.) ausgetestet.

Durch Zugabe unterschiedlicher Mengen 25 mM MgCl₂-Lösung wurde die Endkonzentration im Reaktionsgemisch zwischen 1,5 mM und 2,1 mM variiert. Für die getesteten Stämme lag die optimale MgCl₂ Konzentration bei 1,5 mM.

Verschiedene Primerkonzentrationen wurden sowohl in der Primäramplifikation (1 µM, 5 µM), als auch in der semi-nested Amplifikation (5 µM, 10 µM) getestet. Die optimierten Reaktionsansätze sind in Tab. 3.1. und Tab. 3.2. dargestellt.

Tab. 3.1.: Optimierter Reaktionsansatz für die Primäramplifikation .

Substanz	Volumen	Menge / PCR Ansatz
10 x Puffer (enthält MgCl ₂)	5 µl	75 nmol
dNTP's	8 µl	40 nmol
Primer * (10 µM)	je 0,5 µl	je 5 pmol
Hot Start Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 U
Aqua dest.	29,75 µl	
Probe	5 µl	
Endvolumen	50 µl	

* Primäramplifikation mit Primern V1a, V1b, R1 und R37

Tab. 3.2.: Optimierter Reaktionsansatz für die semi-nested-PCR.

Substanz	Volumen	Menge / PCR Ansatz
10 x Puffer (enthält MgCl ₂)	5 µl	75 nmol
dNTP's	8 µl	40 nmol
Primer * (100 µM)	je 0,5 µl	je 50 pmol
Hot Start Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 U
Aqua dest.	29,75 µl	
Probe	5 µl	
Endvolumen	50 µl	

* semi-nested-PCR mit den Primern V3a, V3b, R1 und R37

III.1.3. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde neben der Variation der Zyklenanzahl besonderer Wert auf die Austestung der Annealingtemperatur gelegt. Diese wurde in beiden Amplifikationsrunden mit Hilfe eines Gradientencyclers zwischen 45,1 °C und 56,9 °C variiert (Abb. 3.3.). Die höchste Sensitivität ergab sich für die in Tab 3.3. angegebenen Zyklusbedingungen.

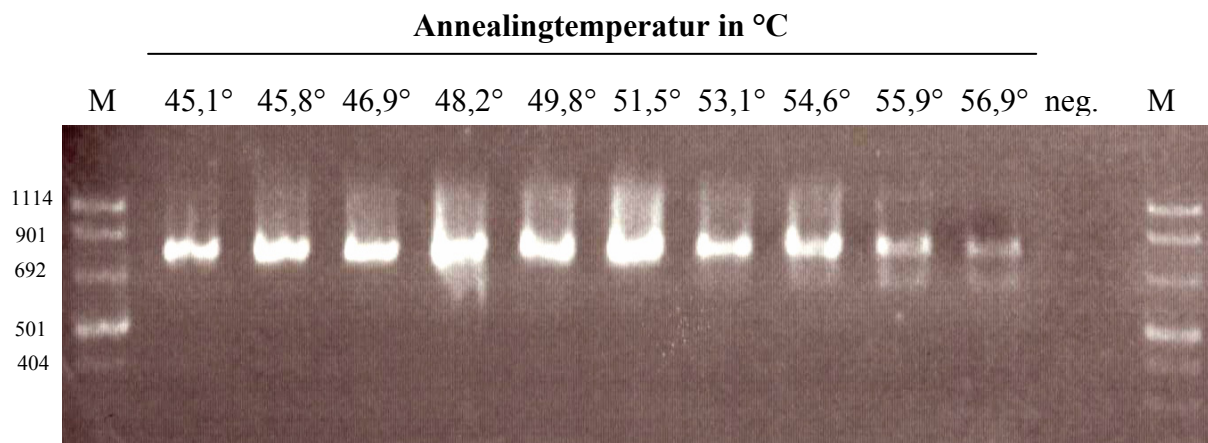


Abb. 3.3.: Agarosegel zur Austestung verschiedener Annealingtemperaturen mit den Primern V3a,V3b, R1 und R37 in einem Gradientencycler mit dem Stamm PKo (*B. afzelii*). Beschriftung: M = DNA Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

Tab. 3.3.: Optimierter Temperaturzyklus für die Primäramplifikation und die semi-nested Amplifikation.

Reaktionsschritt	Temperatur	Reaktionsdauer	
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
2. Denaturierung	94 °C	45 sec	} 30 Zyklen
3. Annealing	48 °C	45 sec	
4. Elongation	72 °C	1 min	
5. Finale Elongation	72 °C	7 min	

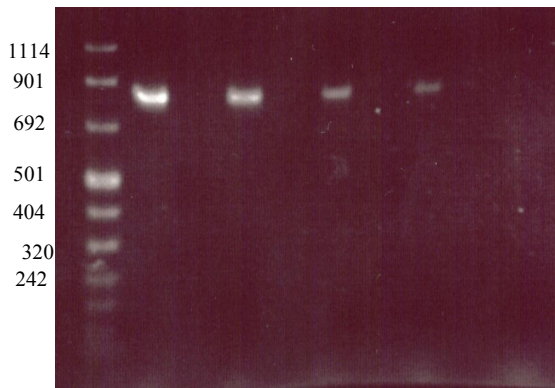
III.1.4. *In vitro* Sensitivitätstestung (analytische Sensitivität)

Die Sensitivitätstestungen erfolgten mit Verdünnungsreihen ausgezählter Borreliensämme. Getestet wurde je ein Stamm der Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und *Borrelia* A14S (Tab. 2.6.). Aufgrund der Heterogenität von *B. garinii* im *ospA*-Gen [204] wurde die Sensitivität für alle 5 *OspA*-Typen von *B. garinii* [215] getrennt evaluiert. Es wurden 1 : 10 Verdünnungsreihen von 10^7 bis 10^3 , sowie Konzentrationen von 2×10^2 , 2×10^1 Borrelien / ml hergestellt und je zweimal getestet.

Als positives PCR Ergebnis wurde eine einzelne spezifische DNA-Bande im Bereich um 800 bp gewertet. Aufgrund unterschiedlicher Mikrodeletionen im *ospA*-Gen ergeben sich für die verschiedenen Stämme geringe Differenzen in der Gesamtlänge des Amplifikats (Tab. 3.4.). Da diese Längendifferenzen in der Praxis nicht zu unterscheiden sind, wird zur Vereinfachung im Weiteren unabhängig von Borrelienspezies das positive PCR-Produkt als 800 bp Bande definiert. Die kleinste Borrelien-Konzentration, welche durch die PCR detektiert werden konnte, lag für alle getesteten Stämme zwischen 2×10^2 und 10^3 Borrelien / ml. Dies entspricht einer Konzentration von ein bis fünf Borrelien pro PCR-Ansatz (Tab. 3.4., Abb. 3.4.).

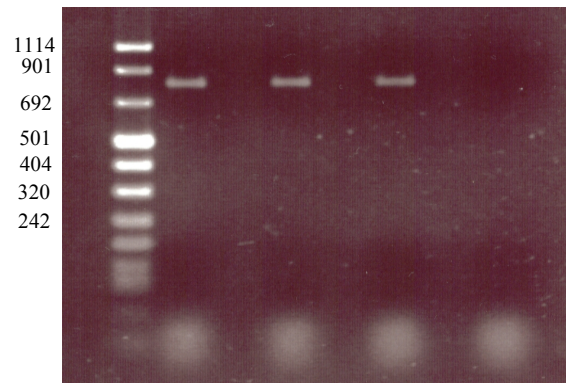
PKa2 (*B. burgdorferi* s.s.):

M 500 50 5 1 0,1



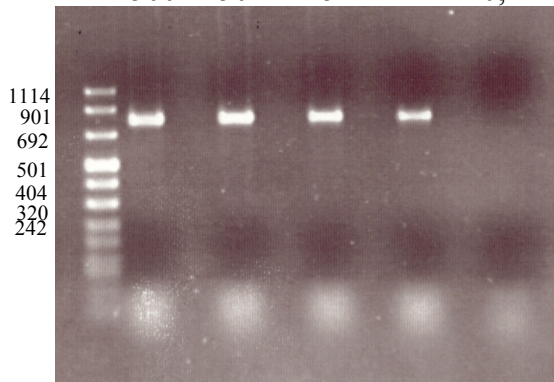
PKo (*B. afzelii*):

M 500 50 5 1



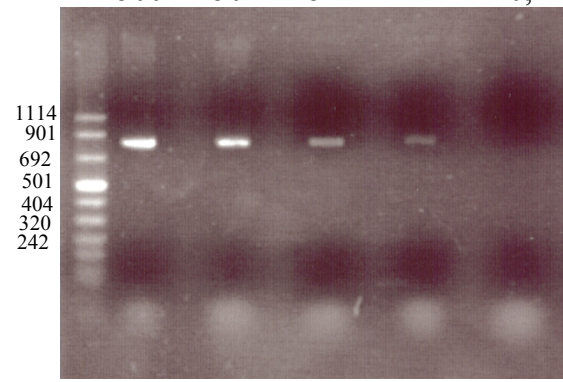
PBr (*B. garinii* OspA-Typ 3):

M 500 50 5 1 0,1



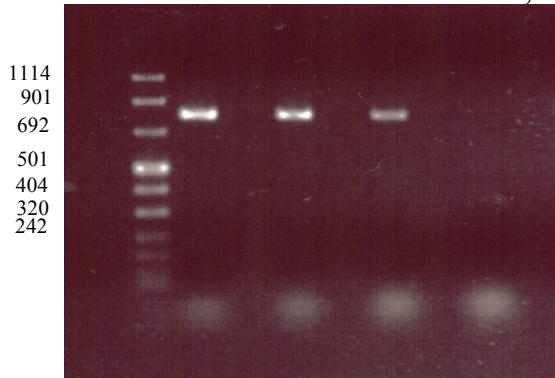
PBi (*B. garinii* OspA-Typ 4):

M 500 50 5 1 0,1



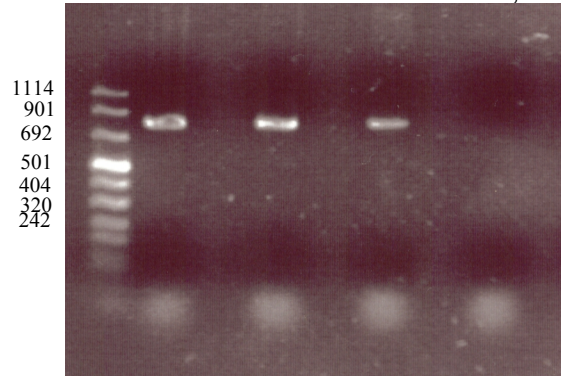
PHei (*B. garinii* OspA-Typ 5):

M 50 5 1 0,1



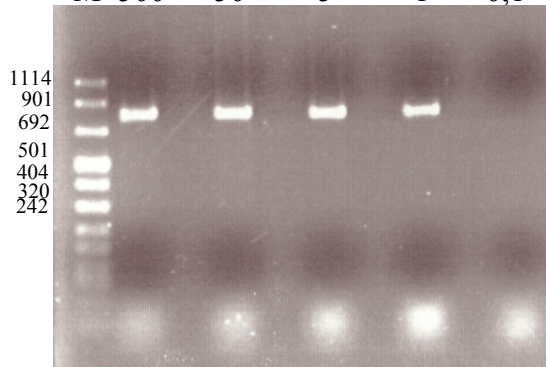
TN (*B. garinii* OspA-Typ 6):

M 50 5 1 0,1



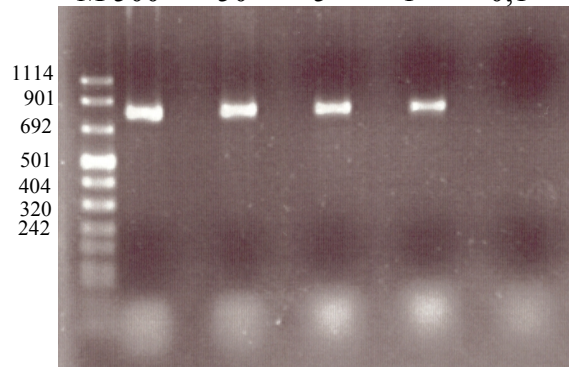
T25 (*B. garinii* OspA-Typ 7):

M 500 50 5 1 0,1



VS116 (*B. valaisiana*):

M 500 50 5 1 0,1



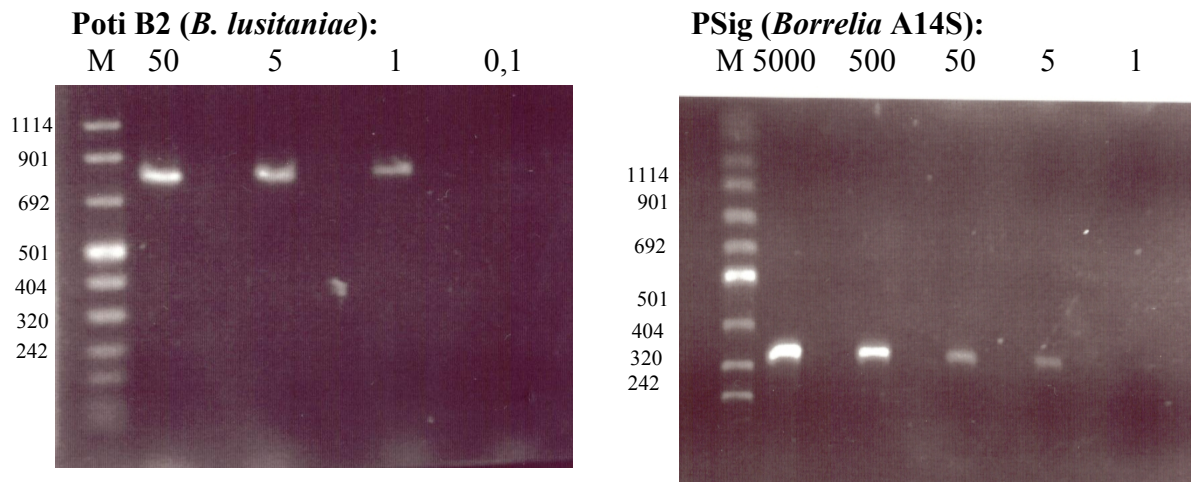


Abb. 3.4. (Seite 43,44): Agarosegele der *in vitro* Sensitivitätstestung mit den Referenzstämmen der verschiedenen Spezies und OspA-Typen. Die oberhalb der Abbildungen angegebenen Zahlen entsprechen der eingesetzten Borrelienzahl pro PCR-Ansatz. M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

Tab. 3.4.: Ergebnisse der Sensitivitätstestung mit Länge der Amplifikationsprodukte.

Borrelienspezies	Stamm	Länge des Amplifikats	<i>Borrelien</i> / ml (<i>Borrelien</i> / PCR Ansatz)		
			10^3 (5)	2×10^2 (1)	2×10^1 (0,1)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	PKa2	798 bp	+	+	-
<i>B. afzelii</i>	PKo	798 bp	+	-	-
<i>B. garinii</i>	PBr	791 bp	+	+	-
<i>B. garinii</i>	PBi	798 bp	+	+	-
<i>B. garinii</i>	PHei	798 bp	+	+	-
<i>B. garinii</i>	TN	801 bp	+	+	-
<i>B. garinii</i>	T25	791 bp	+	+	-
<i>B. valaisiana</i>	VS116	801 bp	+	+	-
<i>B. lusitaniae</i>	Poti B2	807 bp	+	+	-
<i>Borrelia</i> A14S	PSig	798 bp	+	-	-

III.1.5. Evaluierung der Spezifität

Um die Spezifität der Amplifikation für *B. burgdorferi* s. l. zu testen, wurden verwandte Spirochäten der Gattungen *Treponema*, *Leptospira* und *Borrelia* (Tab. 2.7.) in einer hohen Konzentration (10^7 Spirochäten / ml) in die PCR eingesetzt. Von den getesteten *Borrelia* spp. wird lediglich *B. japonica* zu dem *B. burgdorferi* s. l.-Komplex gerechnet [90]. Es ergab sich eine hohe Spezifität der Amplifikation für *B. burgdorferi* s. l.. Bei keiner der *Leptospira* spp. und *Treponema* spp. fand sich eine spezifische Amplifikation in der PCR. Bei den getesteten *Borrelia* spp. ergab nur die Amplifikation von *B. japonica* eine spezifische 800 bp DNA-Bande. Die anderen getesteten *Borrelia* spp. wurden nicht amplifiziert (Abb. 3.5.).

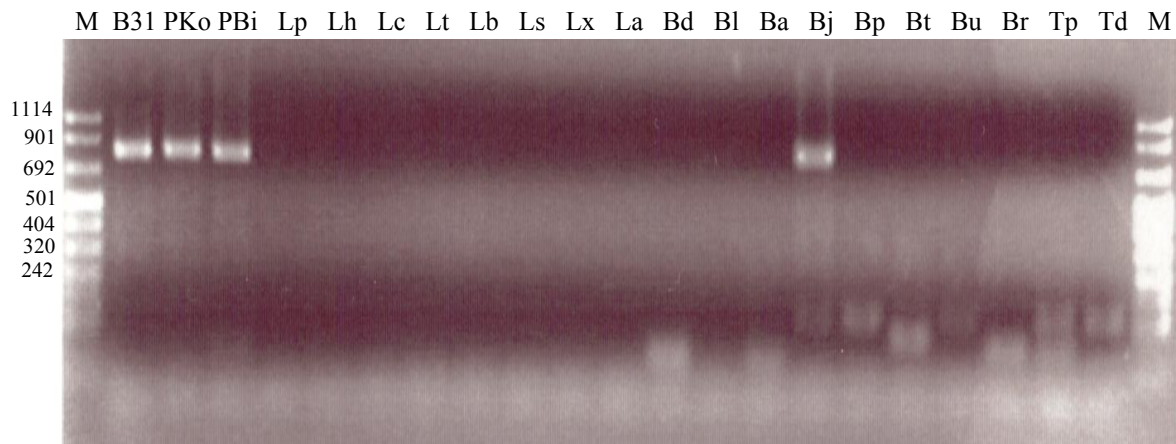


Abb. 3.5.: Agarosegel zur Evaluierung der Spezifität der Amplifikation. Die Spirochäten wurden jeweils in einer Konzentration von 10^7 / ml eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten die Stämme B31, PKo und PBi. *Leptospirae*: *L. pomova* (Lp), *L. hardjö* (Lh), *L. copenhageni* (Lc), *L. tarasona* (Lt), *L. bratislava* (Lb), *L. sejro* (Ls), *L. saxköbing* (Lx) *L. australis* (La). *Borreliae*: *B. duttoni* (Bd), *B. litoralis* (Bl), *B. anserina* (Ba), *B. japonica* (Bj), *B. parkeri* (Bp), *B. tillae* (Bt), *B. turicatae* (Bu) *B. reccurentis* (Br). *Treponemae*: *T. phagedenes* (Tp), *T. denticola* (Td). *B. japonica* (Bj) wird zum *B. burgdorferi* s.l. Komplex gerechnet [90]. M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

III.2. Typisierung der Borrelien-DNA mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)

Zur Spezifizierung und Differenzierung der Amplifikate der *ospA*-PCR wurden diese jeweils mit den Restriktionsenzymen *SspI*, *BglII*, *SfuI*, *Kpn21* und *HindIII* verdaut. Aufgrund individueller Schnittstellen im *ospA*-Gen ergaben sich charakteristische RFLP-Muster für die Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisana*, und *B. lusitaniae* (Abb. 3.6.). Dagegen waren die Schnittmuster der Spezies *B. garinii* heterogen, was die Heterogenität von *B. garinii* im *ospA*-Gen [204] widerspiegelt. Nach Wilske et al. [215] sind mindestens fünf *OspA*-Typen (Typ 3 bis 7) mit *B. garinii* assoziiert. Jeder dieser Typen war durch ein eigenes RFLP-Muster repräsentiert. Abb. 3.6. gibt die Schnittmuster und Bandenlängen wieder, die aus dem Verdau der Referenzstämme (Tab. 2.6.) resultieren. Dabei wird zur besseren Übersicht von einer Gesamtlänge von 800 bp bei jedem Subtyp ausgegangen. Die exakten Bandenlängen unterscheiden sich aufgrund von Deletionen der einzelnen Typen geringfügig und finden sich in Tab 2.10..

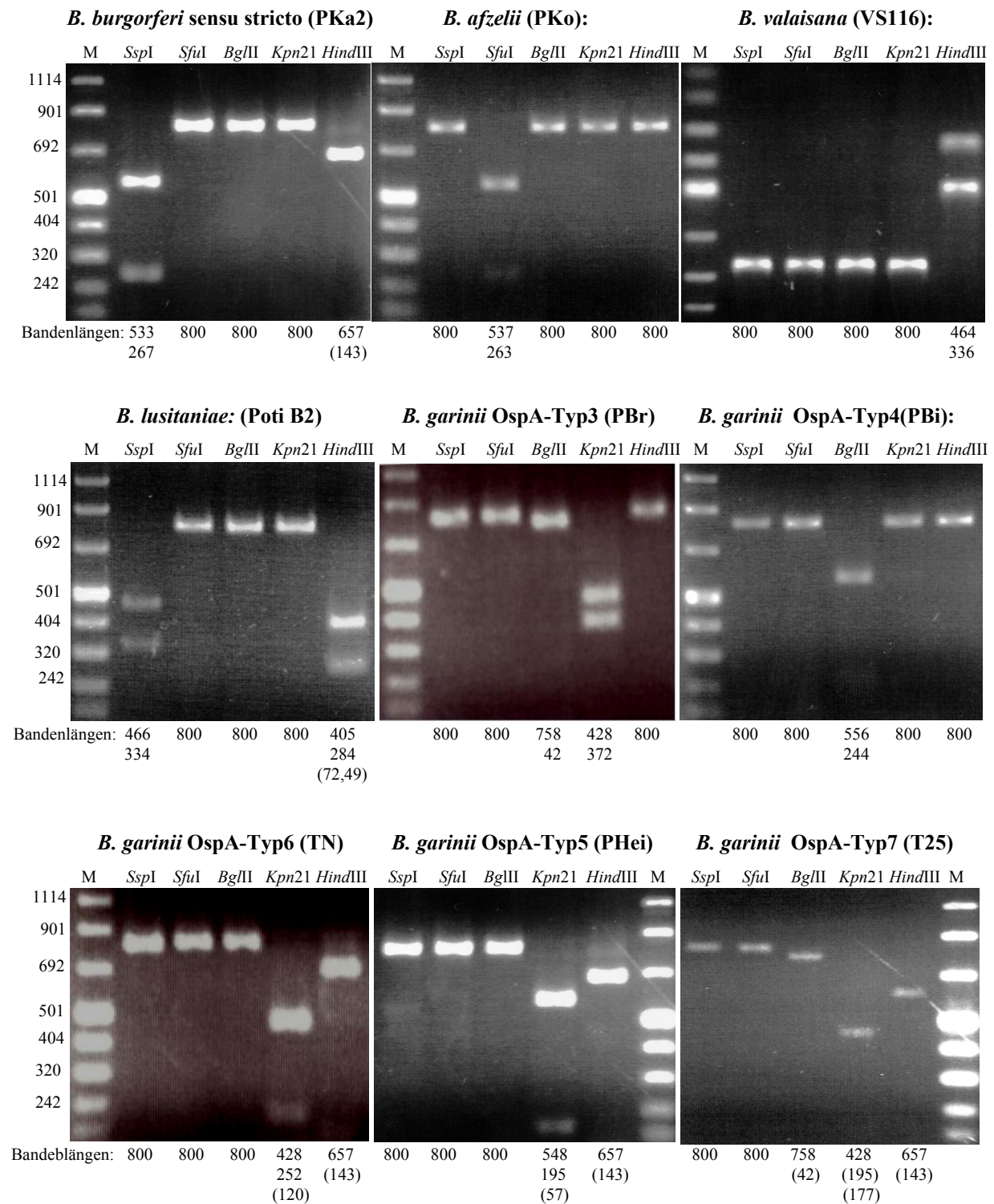


Abb. 3.6.: Restriktionsverdau von Stämmen der Spezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und je einem Stamm der 5 OspA-Typen von *B. garinii* (Namen der Stämme in Klammern) mit den Enzymen *SspI*, *SfuI*, *BglII*, *Kpn21*, *HindIII*. Die Längen der DNA-Fragmente (in bp) sind unter den Bildern für jede Spur angegeben. Eine Länge von etwa 800 bp entspricht dem ungeschnittenen Amplifikationsprodukt. M= DNA-Längenstandard (Molecular weight Marker VIII).

Doppelinfektionen:

Um die Möglichkeiten der Methode zur Differenzierung von Mischkulturen bzw. Mehrfachinfektionen zu evaluieren, wurden schachbrettartig Kombinationen von unterschiedlichen *Borrelia*-Spezies in verschiedenen relativen Konzentrationen getestet. Die Detektion und Differenzierung von Mehrfachinfektionen war für alle getesteten Kombinationen bis zu einem relativen Konzentrationsverhältnis der beteiligten Stämme von 1 / 10 bis 1 / 100 möglich (Tab. 3.5.). Das resultierende RFLP-Muster entsprach einer Mischung der charakteristischen Einzelbilder (Abb. 3.7.).

Tab. 3.5.: Kombinationen von *Borrelia*-Spezies, die in verschiedenen Konzentrationen zur Evaluierung des Restriktionsverdaus getestet wurden.

Stamm 1 (Spezies)	Stamm 2 (Spezies)	Detektionslimit (Konzentrationsverhältnis*)
PKa2 (<i>B. burgdorferi</i> s.s.)	PKo (<i>B. afzelii</i>)	10/1, 1/100
PKa2 (<i>B. burgdorferi</i> s.s.)	PBi (<i>B. garinii</i>)	10/1, 1/10
PKa2 (<i>B. burgdorferi</i> s.s.)	VS116 (<i>B. valaisana</i>)	10/1, 1/100
PKo (<i>B. afzelii</i>)	PBi (<i>B. garinii</i>)	10/1, 1/100

* Angegeben ist das relative Konzentrationsverhältnis, bei dem beide Stämme noch differenziert werden konnten.

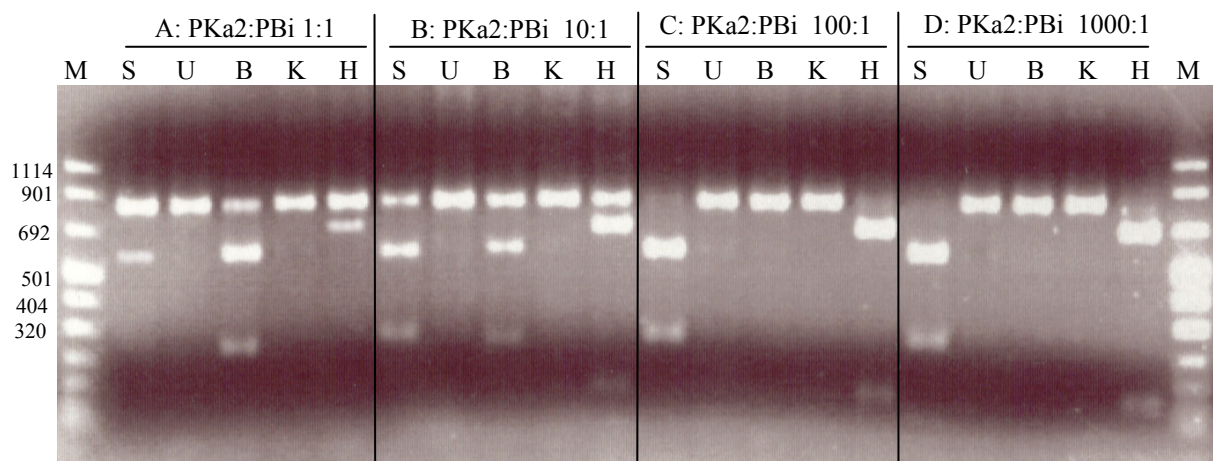


Abb. 3.7.: RFLP-Muster nach Verdau (Enzyme: *SspI* (S), *SfuI* (U), *BglII* (B), *Kpn21* (K), *HindIII* (H)) von Kombinationen mit PKa2 (*B. burgdorferi* s.s.) und PBi (*B. garinii*) in verschiedenen relativen Konzentrationen (A, B, C, D). Das Schnittbild der Doppelinfektion bei A und B entspricht einer Mischung aus beiden Einzelschnittbildern (siehe Abb. 3.6.). M = DNA-Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

III.3. Multiplex-PCR

In der Multiplex-PCR wurden zusätzlich zu den nicht Spezies-spezifischen Primern der *ospA*-PCR in der nested Amplifikation Spezies-spezifische Primer verwendet. Dies ermöglichte eine simultane Detektion und Differenzierung der klinisch relevanten *Borrelia*-Spezies in einem Reaktionsansatz. Bei den Spezies, für die ein spezifischer Primer zur Amplifikation eines kürzeren, Spezies-spezifischen DNA-Fragments im Reaktionsansatz vorhanden war, wurde dieses aufgrund der geringeren Länge bevorzugt amplifiziert: Für *B. burgdorferi* s.s ein 640 bp, *B. afzelii* ein 514 bp und *B. valaisiana* ein 444 bp Amplikon (Länge bezogen auf Konsensussequenz). Beim Einsatz sehr hoher Borrelien-Konzentrationen wurde zusätzlich zum spezifischen PCR-Produkt auch das nicht Spezies-spezifische 800 bp Amplikon schwach sichtbar. Die Amplifikation von *B. garinii* und anderen Spezies, für die kein spezifischer Primer im Reaktionsgemisch enthalten war, ergab hingegen nur das nicht Spezies-spezifische 800 bp DNA-Fragment der *ospA*-PCR-Primer (Tab. 3.6.).

Um eine Kreuzreaktivität der Primer innerhalb des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes auszuschließen, wurden die spezifischen und unspezifischen Primersysteme auch jeweils getrennt mit den verschiedenen *Borrelia*-Spezies in hoher Konzentration (10^7 Borrelien / ml) getestet. Es ergab sich keine Kreuzreaktivität der Spezies-spezifischen Primer (Abb. 3.8.). Spezifische Amplifikationsprodukte der entsprechenden Längen entstanden nur für die zugehörige Spezies. Ein ca. 800 bp Amplikon ohne die Primer R1 und R37 im Ansatz der nested-PCR lässt sich durch Übertrag von DNA und Amplifikation mit Resten dieser Primer aus der ersten Runde erklären.

Tab. 3.6.: Länge der DNA Fragmente, die aus einer Amplifikation mit den einzelnen reverse-Primern bzw. der Kombination der Primer (R1+R37+BSS+BA+BV) in der Multiplex-PCR resultieren. Aufgrund von DNA und Primerübertrag aus der ersten Runde kann eine schwache 800 bp Bande sichtbar sein. Die Längenangaben beziehen sich auf die Konsensussequenz im DNA-Alignment

Spezies	R1, R37	BSS	BA	BV	Kombination
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	800 bp	640 bp	-	-	640 bp*
<i>B. afzelii</i>	800 bp	-	514 bp	-	514 bp*
<i>B. valaisana</i>	800 bp	-	-	444 bp	444 bp*
<i>B. garinii</i>	800 bp	-	-	-	800 bp

*: Bei hohen Borrelien-Konzentrationen wird auch das unspezifische 800bp DNA-Fragment mit amplifiziert.

-: Es findet keine Amplifikation statt

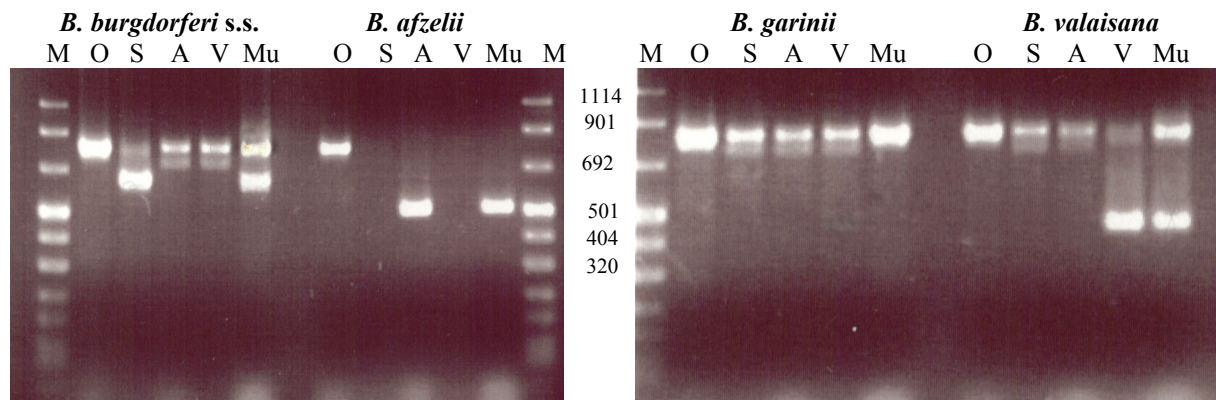


Abb. 3.8.: Agarosegele zur Testung der Kreuzreaktivität der Multiplex-PCR-Primer. Die Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* wurden mit den nicht Spezies-spezifischen Primern R1, R37, V3a / V3b (O), nur mit den Spezies-spezifischen Primern BSS, V3a / V3b für *B. burgdorferi* s.s. (S) bzw. BA, V3a / V3b für *B. afzelii* (A), oder BV, V3a / V3b für *B. valaisiana* (V), und mit der kompletten Primerkombination der Multiplex-PCR R1, R37, BSS, BA, BV, V3a / V3b (Mu) getestet. Die Spezies-spezifischen Primer reagierten nur mit der jeweiligen Spezies. Es ergab sich keine Kreuzreaktivität. Die 800 bp Bande bei der Amplifikation mit den Spezies-spezifischen Primern beruht auf Übertrag der Primer der ersten Runde. M=DNA-Längenstandard (molecular weight marker VIII).

Mit Verdünnungsreihen ausgezählter Borrelien wurde die Sensitivität für den Nachweis von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und allen 5 OspA-Typen von *B. garinii* evaluiert (Stämme siehe Tab. 2.6.). Die kleinste detektierbare Konzentration von Borrelien lag bei einer Borrelie / PCR Ansatz für *B. valaisiana* und die verschiedenen Stämme von *B. garinii* und bei fünf Borrelien / PCR Ansatz für *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* (Abb. 3.9.).

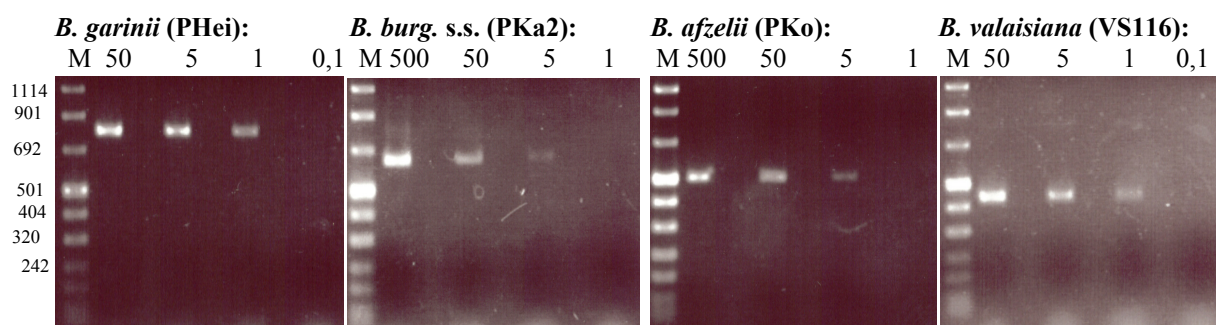


Abb. 3.9.: Agarosegele zur Bestimmung der Sensitivität der Multiplex-PCR mit den Stämmen PHei (*B. garinii*), PKa2 (*B. burgdorferi* s.s.), PKo (*B. afzelii*) und VS116 (*B. valaisiana*). Die Zahlen über den Bildern entsprechen der eingesetzten *Borrelien*-Anzahl pro PCR Ansatz. Die Länge der resultierenden DNA Banden betragen 800 bp für *B. garinii*, 640 bp für *B. burgdorferi* s.s., 514 bp für *B. afzelii* und 444 bp für *B. valaisiana*. M=DNA Längenstandard (Molecular weight marker VIII).

Um die Spezifität der Amplifikation für *B. burgdorferi* s. l. zu testen, wurden die in Tabelle 2.7. aufgelisteten *Borrelia* spp., *Leptospira* spp. und *Treponema* spp. in hoher Konzentration (10^7 Spirochäten / ml) in die PCR eingesetzt. Lediglich bei *B. japonica*, welche dem *B. burgdorferi* s. l. Komplex zugerechnet wird [90], resultierte eine 800 bp DNA-Bande. Die anderen Borrelien, Leptospiren und Treponemen wurden nicht amplifiziert.

III.4. LightCycler

Der Nachweis von *B. burgdorferi* s. l.-DNA mit dem LightCycler wurde sowohl im SYBR Green- als auch im Hyb-Probes-Format durchgeführt. Als Zielgen für die PCR wurde das *ospA*-Gen ausgewählt, da sich hier aufgrund der Heterogenität der Borrelien gute Möglichkeiten zur Differenzierung mittels Hyb-Probes anbieten. In beiden Formaten wurde die LightCycler-PCR als positiv gewertet, wenn sich ein logarithmischen Anstieg der Fluoreszenz bis zum 35. Amplifikationszyklus und ein spezifischen Peak in der Schmelzkurvenanalyse zeigte.

III.4.1. Primervergleich

Zur Optimierung der PCR wurden die drei OspA-Primersets (siehe Tab.2.12.) ‚Standard‘ (V3a / b, R1, R37), ‚Multi‘ (V3a / b, R1, R37, BSS, BA, BV) und ‚Eiffert‘ (OspA2A, OspA2B [46]) als single-run-PCR in Hinblick auf die Sensitivität der Amplifikation verglichen. Jedes dieser Primersysteme wurde im SYBR Green-Format mit den Stämmen PKa2 (*B. burgdorferi* s.s.), PKo (*B. afzelii*), PBi (*B. garinii*) und VS116 (*B. valaisiana*) getestet. Das Vergleichskriterium für die Sensitivität war vor allem der Zeitpunkt des Fluoreszenzanstiegs (Crossing point, siehe Abb. 3.10.). Es ergaben sich keine relevanten Unterschiede der Primersysteme in der Sensitivität für *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*. Bei *B. valaisiana* zeigte sich eine deutlich frühere Amplifikation mit dem Primerset ‚Standard‘ im Vergleich zu den anderen Sets (Abb. 3.10.). Aufgrund dieses Vorteils wurde im Folgenden mit diesem Set (Primer V3a / b, R1 und R37) gearbeitet.

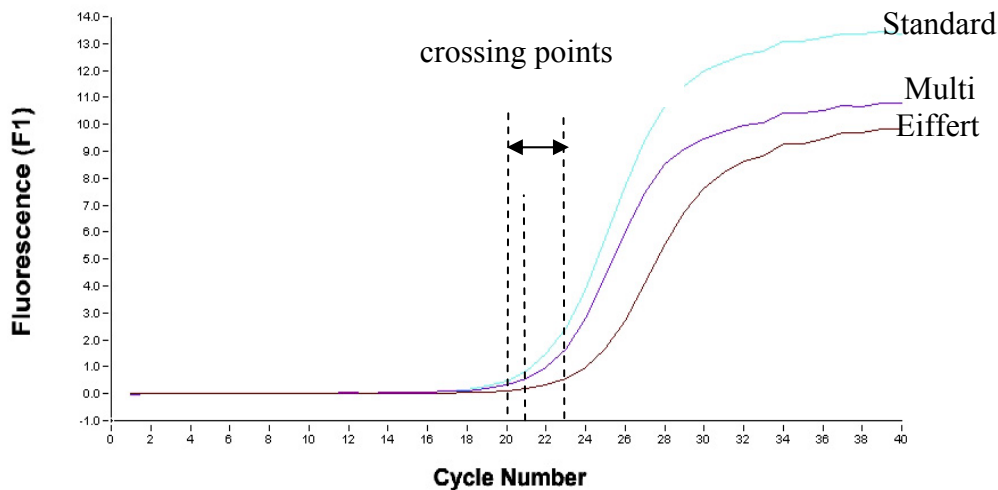


Abb. 3.10.: Fluoreszenzanstieg im SYBR Green-Format (F1) bei der Amplifikation von VS116 (*B. valaisiana*) mit drei verschiedenen OspA-Primersets im Vergleich. Es zeigt sich ein um etwa drei Amplifikationsrunden früherer Anstieg (Pfeil) der Fluoreszenz mit dem Primerset ‚Standard‘ (V3a, V3b, R1, R37) im Vergleich zum Set ‚Eiffert‘ (OspA2A, OspA2B). Der Unterschied zum Set ‚Multi‘ (V3a / b, R1, R37, BSS, BV, BA) fällt geringer aus.

III.4.2. Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmungen

In einer Vortestreihe wurde die Sensitivität der LightCycler PCR als Single-run und als nested-PCR verglichen. Im nested-Format, also mit vorgeschalteter prä-PCR im Block Cycler (analog zur Primäramplifikation der *ospA*-PCR), war die detektierbare Borrelien-Konzentration um den Faktor $10^1 - 10^2$ niedriger als ohne (Single-run). Aufgrund der höheren Sensitivität wurden die folgenden Experimente als nested-PCR durchgeführt.

Die Sensitivität der LightCycler PCR wurde sowohl im Hyb-Probes-Format, als auch im SYBR Green-Format mit Verdünnungsreihen getestet. Im SYBR Green-Format wurde je ein Stamm der Spezies *B. burgdorferi* s.s. (PKa2), *B. afzelii* (PKo), *B. garinii* (PBi) und *B. valaisiana* (VS116) getestet. Aufgrund der stärkeren Sequenzabhängigkeit der Detektion im Hyb-Probes-Verfahren wurden hier neben PBi (OspA-Typ4) zusätzlich Stämme der OspA-Typen 3 bis 7 (siehe Tab 2.6.) getestet. Die detektierbare Borrelienkonzentration der getesteten Stämme lag zwischen 10^3 Borrelien / ml (*B. afzelii*) und 2×10^2 Borrelien / ml (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. valaisiana*, siehe Abb. 3.11., Abb. 3.12.). Dies entspricht 5 bzw. 1 Borrelie(n) / PCR Reaktion.

Bei den im SYBR Green und im Hyb-Probes-Format getesteten *Leptospira* spp. und *Treponema* spp. erfolgte keine Amplifikation. Von den getesteten *Borrelia*-Stämmen wurde lediglich die dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex zugehörige *B. japonica* amplifiziert, mit einer T_m von 51,4 °C in der Schmelzkurvenanalyse.

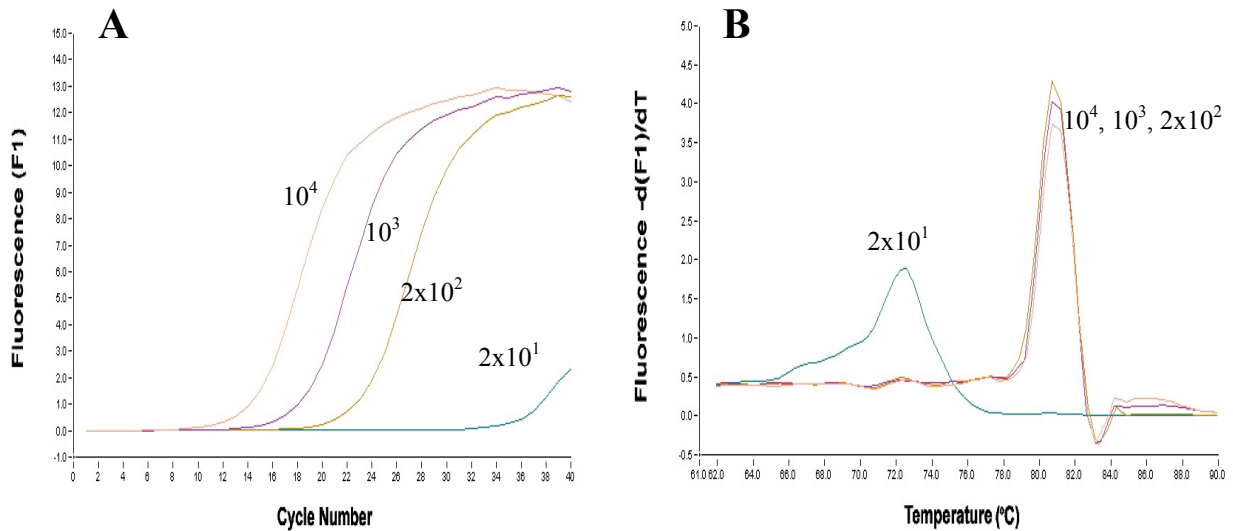


Abb. 3.11.: Bestimmung der Sensitivität der LightCycler-PCR im SYBR Green-Format (Kanal F1) für den Stamm PBi (*B. garinii*). Es wurden 10^4 , 10^3 , 2×10^2 und 2×10^1 Borrelien pro ml in die PCR eingesetzt. A: Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit. B: Schmelzkurvenanalyse. Für 10^4 , 10^3 und 2×10^2 Borrelien / ml ist die PCR positiv (logarithmischer Anstieg der Fluoreszenz und ein spezifischer Peak in der Schmelzkurvenanalyse). Ein Peak bei ca. 73 °C in der Schmelzkurve (2×10^1 Borrelien / ml) entspricht unspezifischen Amplifikationsprodukten und Primerdimeren.

PKo (*B. afzelii*):

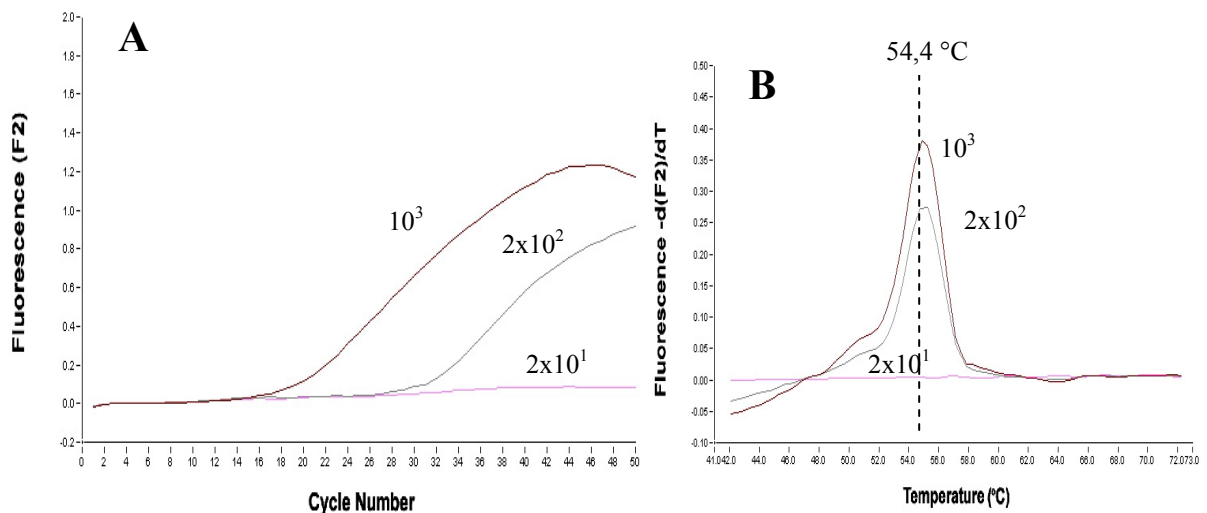


Abb. 3.12.: Evaluierung der Sensitivität der LightCycler-PCR im Hyb-Probes-Format (F2) für den Stamm PKo (*B. afzelii*). Es wurden je 10^3 , 2×10^2 und 2×10^1 Borrelien / ml in die PCR eingesetzt. A: Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit. B: Schmelzkurvenanalyse. Für jeweils 10^3 und 2×10^2 Borrelien / ml ist die PCR positiv.

III.4.3. Typisierung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit Hyb-Probes

Anhand des DNA-Sequenz-Alignments wurden die verwendeten Hyb-Probes HP3 und HP4 auf ihre Übereinstimmung mit den Gensequenzen der einzelnen Borrelien analysiert. Es ergaben sich jeweils charakteristische Muster von Fehlpaarungen mit *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Bei *B. garinii* hingegen waren die Mismatch-Muster heterogen. Für jeden der fünf OspA-Typen von *B. garinii* [215] zeigte sich eine eigene Verteilung der Fehlpaarungen mit HP3 und HP4 (Tab. 3.7., Abb. 2.4.)

Tab. 3.7.: Anzahl der verschiedenen Basenfehlpaarungen der einzelnen Borrelien-Spezies und OspA-Typen mit den Hyb-Probes HP3 und HP4.

Spezies	Fehlpaarungen* mit HP3			Fehlpaarungen* mit HP4		
	AT	GC	gesamt	AT	GC	gesamt
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	3	1	4	2	0	2
<i>B. afzelii</i>	3	0	3	1	1	2
<i>B. valaisiana</i>	3	1	4	2	2	4
<i>B. lusitaniae</i>	4	1	5	1	2	3
<i>B. garinii</i> OspA 3	2	1	3	1	2	3
<i>B. garinii</i> OspA 4	1	1	2	1	0	1
<i>B. garinii</i> OspA 5	1	1	2	2	1	3
<i>B. garinii</i> OspA 6	4	1	5	2	0	2
<i>B. garinii</i> OspA 7	3	1	4	2	0	2

* aufgrund thermodynamischer Unterschiede aufgetrennt nach AT- und GC-Fehlpaarungen.

Zur Evaluierung der Typisierbarkeit der Borrelien mit Hilfe der Hyb-Probes HP3 und HP4 wurden mit diesen insgesamt 68 verschiedene *B. burgdorferi* s. l. Stämme charakterisiert - darunter 19 *B. burgdorferi* s.s., 26 *B. afzelii*, 21 *B. garinii*, eine *B. valaisiana* und eine *B. lusitaniae*. Parallel erfolgte für alle Stämme eine Typisierung mittels RFLP. 34 wurden zusätzlich sequenziert. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methodik wurden die verschiedenen Spezies und OspA-Typen mehrfach getestet. Insgesamt wurden somit 110 definierte Proben im Hyb-Probes-Format typisiert (siehe Anhang 1).

Für *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* ergab sich je ein Spezies-typischer Schmelzbereich. Die Schmelzkurvenanalyse der verschiedenen *B. garinii* Stämme ergab, korrespondierend zu den OspA-Typen dieser Spezies [215], mehrere Schmelzbereiche (Abb. 3.13.). Tab. 3.8. zeigt die verschiedenen Schmelzbereiche (T_m -Gruppen) und ihre Variationsbreiten.

Mit dem Student t-Test wurde die Signifikanz der Unterschiede zwischen angrenzenden Schmelzbereichen berechnet. Für alle Vergleiche waren die Unterschiede mit $p < 0,05$ signifikant (aufsteigend nach T_m geordnet): *B. garinii* OspA-Typ 6 vs. *B. lusitaniae* $p = 0,022$, *B. lusitaniae* vs. *B. burgdorferi* s.s. $p = 0,034$, *B. burgdorferi* s.s. vs. *B. valaisiana* $p = 4,2 \times 10^{-6}$, *B. valaisiana* vs. *B. garinii* OspA-Typ 7 $p = 2,4 \times 10^{-7}$, *B. garinii* OspA-Typ 7 vs. *B. garinii* OspA-Typ 3 $p = 0,0002$, *B. garinii* OspA-Typ 3 vs. *B. afzelii* $p = 5,0 \times 10^{-11}$, *B. afzelii* vs. *B. garinii* OspA-Typ 5 $p = 1,4 \times 10^{-8}$ und *B. garinii* OspA-Typ 5 vs. *B. garinii* OspA-Typ 4 $p = 0,004$.

Die fünfmalige (*B. lusitaniae* zweimalige) Testung der Typstämme (Tab. 2.6.) ergab eine gute Reproduzierbarkeit der Schmelzpunkte. Insgesamt lag die Streubreite innerhalb der T_m -Gruppen (Inter-Test-Variabilität) zwischen 0,2 °C für *B. valaisiana* und 1,4 °C für *B. afzelii* (Tab. 3.8.). Die Intra-Test-Streubreite war hingegen mit 0,1 °C bis 0,7 °C deutlich geringer. Es ergab sich eine Intra-Test-Überschneidung (Überschneidung von T_m -Bereichen innerhalb eines PCR-Laufs) zwischen *B. burgdorferi* s.s. und *B. valaisiana*. Innerhalb der Spezies *B. garinii* gab es zwei Inter-Test-Überschneidungen (Überschneidung von T_m -Bereichen in unterschiedlichen PCR Läufen): *B. garinii* OspA-Typ 3 mit 7 und OspA-Typ 4 mit 5 (Abb. 3.14.).

Tab. 3.8.: Mittelwert und Variabilität der Schmelzbereiche für die verschiedenen Borrelien Spezies und OspA-Typen.

Spezies	Anzahl d. Messungen	T_m -Werte (°C)	Streubreite	Mittelwert (°C)	Standardabweichung
<i>B. garinii</i> (OspA-6)	12	46,2 - 46,6	0,3 °C	46,3	0,13
<i>B. lusitaniae</i>	2	47,8 - 48,0	0,2 °C	47,9	0,14
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	25	49,1 - 49,6	0,5 °C	49,3	0,13
<i>B. valaisiana</i>	6	49,5 - 49,7	0,2 °C	49,6	0,06
<i>B. garinii</i> (OspA-7)	7	51,4 - 52,1	0,7 °C	51,7	0,28
<i>B. garinii</i> (OspA-3)	10	51,9 - 53,0	1,1 °C	52,5	0,32
<i>B. afzelii</i>	31	54,0 - 55,4	1,4 °C	54,3	0,31
<i>B. garinii</i> (OspA-5)	7	56,5 - 57,4	0,9 °C	56,8	0,31
<i>B. garinii</i> (OspA-4)	10	57,1 - 58,3	1,2 °C	57,7	0,68

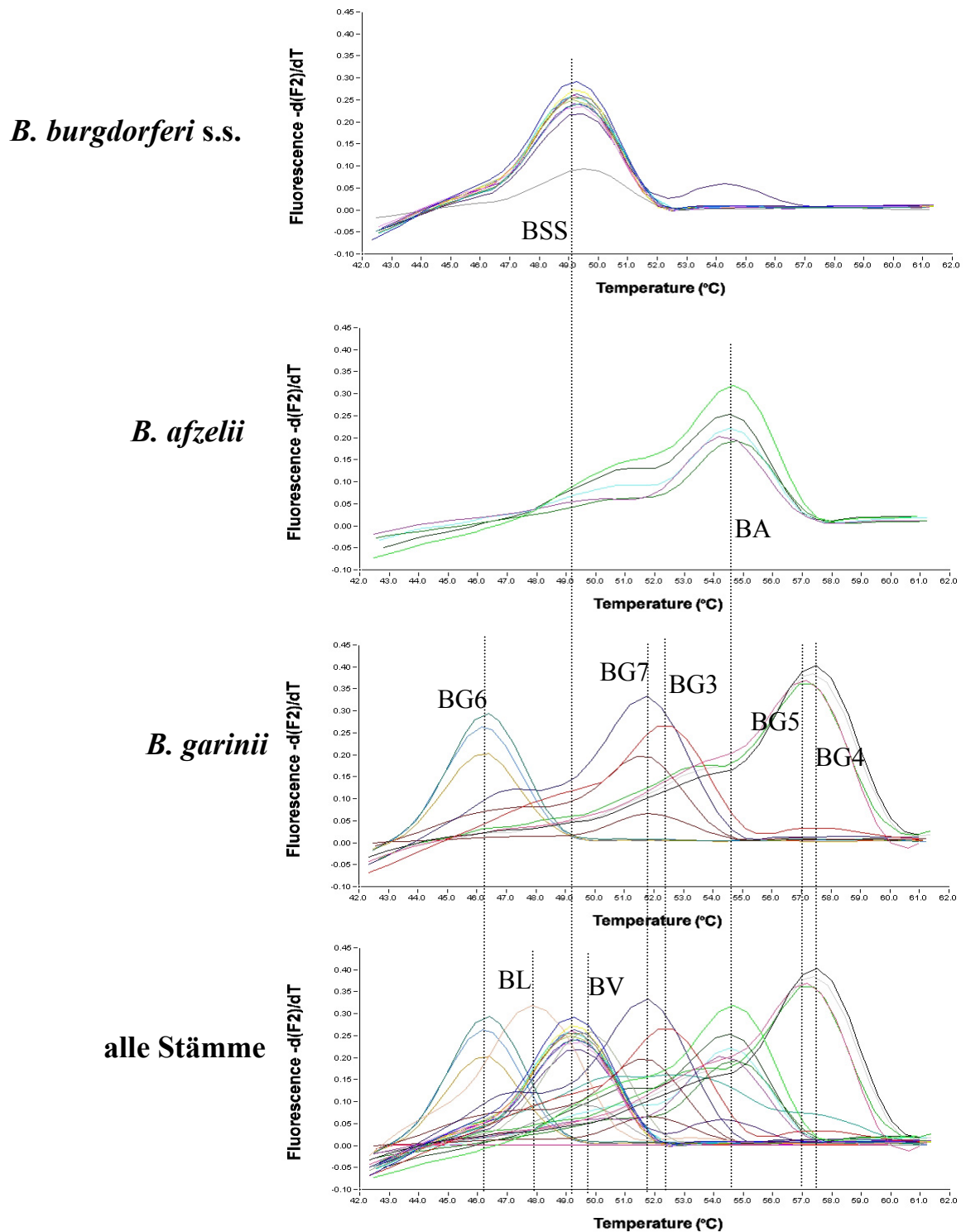


Abb. 3.13.: Die Grafik zeigt eine Schmelzkurvenanalyse von 22 Liguorisolaten. Als Positivkontrolle und interne T_m -Kalibratoren dienten die Stämme B31, PKo, PBr, PBi, PHei, PWud II, T25, VS116 und Poti B2. Die Schmelzkurven sind zusätzlich getrennt nach Spezies dargestellt. Für *B. burgdorferi s.s.* (BSS) und *B. afzelii* (BA) ergibt sich eine homogene Schmelzkurvenverteilung. Die verschiedenen OspA-Typen von *B. garinii* (BG3-BG7) spiegeln sich in der heterogenen Verteilung der Schmelzpunkte wieder. BV = *B. valaisana*; BL = *B. lusitaniae*. Die senkrechten gestrichelten Linien markieren die verschiedenen Schmelzpunkte.

Im Weiteren wurde versucht, anhand der ermittelten Daten Grenzwerte für die Zuordnung von Proben zur entsprechenden Spezies bzw. OspA-Typ festzulegen. Als Grenzwert zwischen zwei angrenzenden T_m -Gruppen wurde jeweils die Mitte zwischen den entsprechenden T_m -Mittelwerten definiert (Tab. 3.9.). Um die aufgestellten Regeln zu evaluieren, wurden retrospektiv allen getesteten Stämme nach den definierten Grenzwerten jeweils Spezies und OspA-Typ zugeordnet. Bei 110 getesteten Proben ergaben sich zwei Fehldiagnosen bei der Spezieszuteilung und sechs Fehldiagnosen bei der Zuteilung des OspA-Typs innerhalb *B. garinii*. Mit den erstellten Grenzwerten für die einzelnen T_m -Bereiche ließ sich somit eine richtige Spezieszuordnung in 98 % der Fälle erzielen; und eine richtige Zuordnung des OspA-Typs innerhalb der Spezies *B. garinii* in 87 % der Fälle. Die erreichte Sensitivität der Zuordnungen zu den einzelnen Gruppen lag mit Ausnahme der von OspA-Typ 4 und 5 für alle T_m -Gruppen über 90 %. Im Einzelnen ist die Sensitivität der Zuordnungen in Tab. 3.9. wiedergegeben.

Tab. 3.9.: T_m -Gruppen mit T_m -Mittelwert und T_m -Grenzwerten (Mitte zwischen den T_m -Mittelwerten), Anzahl der Fehlzugeordnungen und Sensitivität der Zuordnung.

T_m -Gruppe	T_m -Mittelwert	T_m -Grenzwerte	falsche Zuordnung	Sensitivität*
<i>B. garinii</i> OspA-6	46,3	46-47,1	-	12/12 (100%)
<i>B. lusitaniae</i>	47,9	47,1 - 48,6	-	2/2 (100%)
<i>B. burg. s.s.</i>	49,3	48,6 - 49,45	2	23/25 (92%)
<i>B. valaisiana</i>	49,6	49,45 - 50,65	-	6/6 (100%)
<i>B. garinii</i> OspA-7	51,7	50,65 - 52,1	-	7/7 (100%)
<i>B. garinii</i> OspA-3	52,5	52,1 - 53,4	1	9/10 (90%)
<i>B. afzelii</i>	54,3	53,4 - 55,55	-	31/31 (100%)
<i>B. garinii</i> OspA-5	56,8	55,55 - 57,25	1	6/7 (86%)
<i>B. garinii</i> OspA-4	57,7	57,25-59	4	6/10 (60%)

Eine weitere Verbesserung der Spezies- bzw. OspA-Typ-Differenzierung konnte durch das Mitführen von Typstämmen der verschiedenen *Borrelia*-Subtypen als interne Standards und T_m -Kalibratoren erreicht werden. T_m -Verschiebungen zwischen den einzelnen Läufen wurden so berücksichtigt und aufgrund der geringen T_m -Streuung innerhalb der Läufe konnten Inter-Test-Überschneidungen teilweise eliminiert werden. Eine Orientierung an den mitgeführten Standards der OspA-Typen 4 und 5 erhöhte die Sensitivität der Zuordnungen zu Typ 4 von 60 % (6 von 10) auf 90 % (9 von 10) und die Spezifität der Zuordnung zu OspA-Typ 5 von 64 % (7 von 11) auf 88 % (7 von 8). Aufgrund der Intra-Test-Überschneidung bei der Differenzierung von *B. burgdorferi* s.s. und *B. valaisiana* war die Spezifität der Zuordnung zu diesen Gruppen (siehe Tab. 3.9.) durch interne Standards nicht zu verbessern.

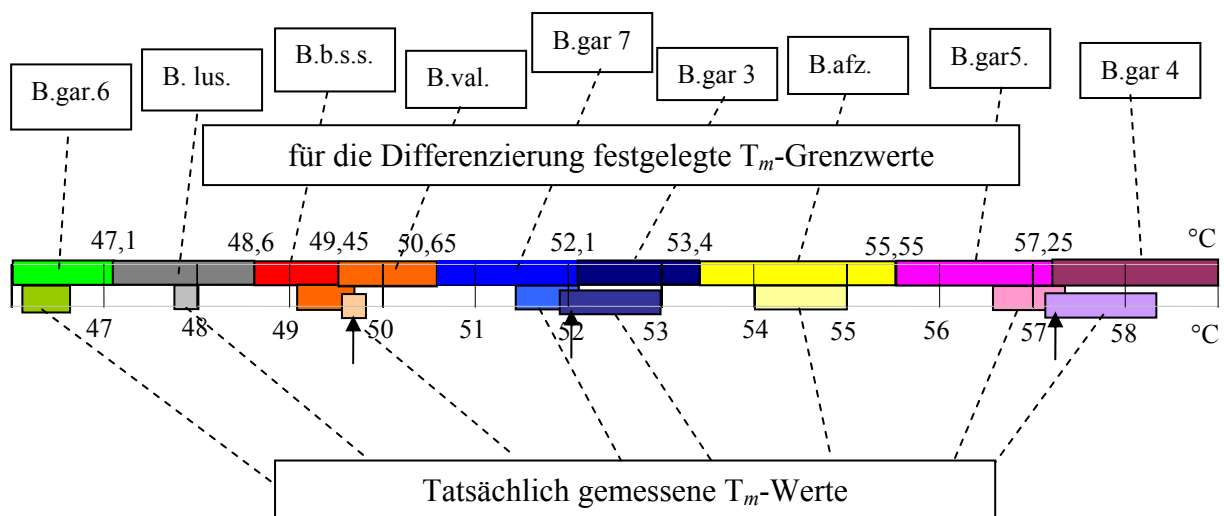


Abb. 3.14: Vergleich der für die Differenzierung festgelegten T_m -Grenzwerte (Balken) mit den tatsächlich gemessenen T_m -Werten (je für Spezies *B. burgdorferi* s.s. (B.b.s.s.), *B. afzelii* (B. afz), *B. valaisiana* (B. val), *B. lusitaniae* (B.lus) und der OspA-Typen von *B. garinii* (B.gar 3 bis 7)). Die Pfeile markieren Bereiche, in denen tatsächliche T_m -Werte nicht innerhalb der festgelegten Grenzen der jeweiligen Gruppe liegen.

III.5. Vergleich der verschiedenen Methoden

Zusätzlich zu den definierten Referenzstämmen wurden Borrelien aus insgesamt 152 positiven Proben typisiert (Tab. 3.10.): 72 DNA Extraktionen von Zecken, 59 Patientenisolat und 20 DNA Extraktionen von klinischem Material. Alle Amplifikate wurden mittels Restriktionsenzymverdau analysiert. Außerdem wurden 83 Proben mit der Multiplex-PCR und 51 mit dem LightCycler im Hyb-Probes-Format differenziert. Bei 75 Proben wurde zur Kontrolle eine Sequenzanalyse des *ospA*-Gens durchgeführt.

Tab. 3.10.: Anzahl der typisierten Borrelien aus den unterschiedlichen Probenmaterialien mit den verschiedenen Typisierungsmethoden.

Proben	RFLP (alle Proben)	Multiplex-PCR	LightCycler	Sequenziert
Zecken	72	13	-	-
Isolate (Patienten)	59	59	51	56
Direktpräparate (Patienten)	20	11		19
gesamt	152	83	51	75

Übereinstimmung der Methoden:

Von den 152 typisierten Borrelien ergab sich bei 151 ein RFLP-Schnittmuster, das sich nach den Mustern der Referenzstämme eindeutig zu Spezies bzw. OspA-Typ zuordnen ließ (für das Zeckenisolat Z319 ergab sich ein unbekanntes RFLP-Muster). Insgesamt wurden 93 Borrelien parallel mit einer anderen Methode typisiert. Bei 91 davon (98 %) stimmten die Ergebnisse aller verwendeten Typisierungsmethoden überein. Für das Patientenisolat PGeb und die Patientenprobe P1771 ergaben sich abweichende Ergebnisse bezüglich RFLP-Analyse und DNA-Sequenzierung:

PGeb: Das Schnittmuster der RFLP-Analyse von PGeb war identisch mit dem einer *B. garinii* OspA-Typ 6. Bei der durchgeführten Sequenzierung und DNA-Analyse eines 463 Basen langen *ospA*-Fragments von PGeb ergab sich jedoch eine hohe Übereinstimmung von 99,8 % mit dem *ospA*-Gen des *B. bissettii* Stamms DN127 [142], dagegen nur 83 % mit dem OspA-Typ 6 Stamm TN. Die weitere Analyse zeigte, dass sowohl PGeb als auch DN127 die für *B. garinii* OspA-Typ 6 charakteristischen Schnittstellen für Kpn 21 besitzen (Abb. 3.15.).

232

TN (Typ6): ACACTTGAAGG **TGA**AAAA**ACTGACAAAAGTAAAGTAAAATTAACAATTCTGATGACTNAGTCA**AACTA
 PGeb (*B.bi*): ATACTTGAAGGCGTAAAAGCTGACAAAAGCAAAGTAAAATTAACAGTTTCTGAGGATCTCAGCACAACTA
 DN127 (*B.bi*): ATACTTGAAGGCGTAAAAGCTGACAAAAGCAAAGTAAAATTAACAGTTTCTGAGGATCTCAGCACAACTA

302

AATTTGAAATT **TC**AAAGAAGATGGCAAACATT**AGTATCAAAAAAAGTAAAC**CCTTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAA
 CACTTGAAGTTCTAAAAGAAGATGGCAAACATTGGTGTCAAAAAAACAACCTTCTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAA
 CACTTGAAGTTCTAAAAGAAGATGGCAAACATTGGTGTCAAAAAAACAACCTTCTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAA

382

AA**TTTCAACGAA**AACGGT**GAAACAT**CTGAAAAACAATA**GT**AAGAGCAAAT**GGA**ACCAGACTTGAATACACAGAC**AT**AA
 AAGTTCAATGACAAAGGCGAATTAGCTGAAAAACAATGGTAAGAGCAAACCGAACCAGACTTGAATACACAGAAGTTAA
 AAGTTCAATGACAAAGGCGAATTAGCTGAAAAACAATA**GT**AAGAGCAAACCGAACCAGACTTGAATACACAGAAGTTAA

462

AAGCGATGGA**TCCGGA**AAAGCTAAAGAACTTTTAAAGACT**TTT**CTCTTGAAGGAACTCTAG**CTG**CTGA**CGGC**AAA**CAA**
 AAGCGATGGA**TCCGGA**AAAGCTAAAGAACTTTTAAAGACTATGCTCTTGAAGGAACTCTAACTGCTGA AAAAGCAA
 AAGCGATGGA**TCCGGA**AAAGCTAAAGAACTTTTAAAGACTATGCTCTTGAAGGAACTCTAACTGCTGA AAAAGCAA

542

CATTG**AAA**GTTA**GAA**AGG**CA**CTGTT**GT**TTTAAAG**GA**AGACATTT**AAAA****TCCGGA**GAA**ATA**CAG**TTG**CACTT**GAT**GAC
 CATTGGTGGTTAAAGAAGGAAC**TGTT**ACTTTAAAGTAAGCACATTTCAA**AAATCCGGA**GAA**GTAA**CAGCTGAGCTTAATGAC
 CATTGGTGGTTAAAGAAGGAAC**TGTT**ACTTTAAAGTAAGCACATTTCAA**AAATCCGGA**GAA**GTAA**CAGCTGAGCTTAATGAC

622

CTGACACT**ACT**CAG**G**CTACTAAAAAACTGGAAAATGGGAT**CA**AAAGACTTC**CA**CTTTAAACAATTAG**GT**GAA**TA**
 ACTGACAGTGC**CA**AGCTACTAAAAAACTGGAAAATGGGATGCGGAACTT**CA**ACTTTAAACAATTAGCGTAAACA
 ACTGACAGTGC**CA**AGCTACTAAAAAACTGGAAAATGGGATGCGGAACTT**CA**ACTTTAAACAATTAGCGTAAACA

Abb. 3.15.: Sequenz-Alignment eines *ospA*-Fragments des Stamms PGeb mit dem *B. bissettii* (*B.bi*) Isolat DN127 (Mismatches pink) und dem *B. garinii* OspA-Typ6 Isolat TN (Mismatches grün). Die eigentlich für *B. garinii* OspA-Typ6 charakteristischen Schnittstellen für Kpn 21 sind rot hervorgehoben.

P1771: In der RFLP-Analyse ergab sich für P1771 das Schnittmuster einer *B. garinii* OspA-Typ 6. In der parallel durchgeführten DNA-Sequenzanalyse zeigte sich eine hohe Homologie (je über 99 % Übereinstimmung) zu den *B. garinii* Stämmen PLa und PKi (Abb. 3.16.), die nach Wilske et al. keinem der OspA-Serotypen 1 bis 7 zuzuordnen sind, sondern als eigener OspA-Typ 8 definiert wurden [208]. Die Übereinstimmung mit dem Stamm TN (OspA-Typ 6) hingegen betrug nur 92 %. P1771 wurde deshalb der Gruppe *B. garinii* OspA-Typ 8 zugeordnet, obwohl P1771 die für *B. garinii* OspA-Typ 6 charakteristischen Schnittstellen für Kpn 21 im *ospA*-Gen besitzt.

```

      87
PKi (Typ8):  AAAAAATAGCGTTTCAGTAGATTTACCTGGTGGAAATGACAGTTCCTGTAAAGTAAAGAAAACAGACAAAGAT
P1771 (Typ8):      TAGCGTTTCAGTAGATTTACCTGGTGGAAATGACAGTTCCTGTAAAGTAAAGAAAACAGACAAAGAT
TN (Typ6):  AAAAAATAGCGTTTCAGTAGATTTACCTGGTGGAAATGACAGTTCCTGTAAAGTAAAGAAAACAGACAAAGAC

147
GGTAAATACAGCCTAATGGCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAAAACAACGGTTCCTGGAACACT
GGTAAATACAGCCTAATGGCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAAAACAACGGTTCCTGGAACACT
GGTAAATACAGCTAGAGGCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAAAACAACGGTTCCTGGAACACT

207
TGAAGGTGAAAAAAGTACAAAAGTAAAGTAAATTAACAATTGCTGAGGATCTAAGTAAAACCACATTTGAAATCTTCA
TGAAGGTGAAAAAAGTACAAAAGTAAAGTAAATTAACAATTGCTGAGGATCTAAGTAAAACCACATTTGAAATCTTCA
TGAAGGTGAAAAAAGTACAAAAGTAAAGTAAATTAACAATTGCTGAGGATCTAAGTAAAACCACATTTGAAATCTTCA

267
AAGAAGATGGCAAAAACATTAGTATCAAAAAAAGTAACCCTTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAAAAATTTGATGAAAA
AAGAAGATGGCAAAAACATTAGTATCAAAAAAAGTAACCCTTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAAAAATTTGATGAAAA
AAGAAGATGGCAAAAACATTAGTATCAAAAAAAGTAACCCTTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAAAAATTTCAACGAAAA

387
GGTGCCGTAACGAAAAAGTAATGACAAGAAAAGACGGAACCAGACTTGAATACACAGACATAAAAAACGATGGAATCCGG
GGTGCCGTAACGAAAAAGTAATGACAAGAAAAGACGGAACCAGACTTGAATACACAGACATAAAAAACGATGGAATCCGG
GGTGAAACATCTGAAAAAACATAAGTAAAGCAATGGAACCAGACTTGAATACACAGACATAAAAAACGATGGAATCCGG

447
AAAAGCTAAAGAAGTTTTAAAAGACTTTACTCTTGAAGGAACTCTAGCTGCTGACGGCAAAAACAACATTAACAGTTAAAG
AAAAGCTAAAGAAGTTTTAAAAGACTTTACTCTTGAAGGAACTCTAGCTGCTGACGGCAAAAACAACATTAACAGTTAAAG
AAAAGCTAAAGAAGTTTTAAAAGACTTTACTCTTGAAGGAACTCTAGCTGCTGACGGCAAAAACAACATTAACAGTTAAAG

507
AGAGCACTGTTACTTTAAGCAAGAACATTTCAAAAATCCGGAGAAATAACAGTTGCACTTGTACTCTGACTCTGACTCTA
AGAGCACTGTTACTTTAAGCAAGAACATTTCAAAAATCCGGAGAAATAACAGTTGCACTTGTACTCTGACTCTGACTCTA
AAGCACTGTTCTTTAAGCAAGAACATTTCAAAAATCCGGAGAAATAACAGTTGCACTTGTACTCTGACTCTGACTCTA

```

Abb. 3.16.: Sequenz-Alignment eines OspA-Fragments von P1771 mit dem *B. garinii* Isolat PKi (OspA-Typ 8) und TN (OspA-Typ 6). Rot kennzeichnet die eigentlich für *B. garinii* OspA-Typ6 charakteristischen Schnittstellen für Kpn 21.

Das RFLP-Schnittmuster der *B. burgdorferi* s.l. positiven Zecke Z319 unterschied sich von den Schnittmustern aller Referenzstämme und ließ sich somit keiner Spezies bzw. keinem OspA-Typ zuordnen: Das 800 bp PCR Produkt blieb jeweils ungeschnitten durch die Enzyme *SspI*, *SfuI* und *Kpn21*. Der Verdau mit *BglIII* und *HindIII* resultierte in kürzere DNA-Banden

III.6. Untersuchung von nüchternen Zecken

III.6.1. Prävalenz

In einer explorativen Studie wurden 529 *I. ricinus* Zecken aus drei Sammelgebieten und drei Sammelzeitpunkten mit der *ospA*-PCR getestet. Bei 67 Zecken ergab die PCR eine einzelne, *B. burgdorferi* s.l typische, 800 bp DNA-Bande, die durch RFLP-Analyse spezifiziert werden konnte. Dies entspricht einer Borrelien-Prävalenz von 13 % für alle getesteten Zecken. Die Auswertung der Prävalenzdaten erfolgte sowohl in Bezug auf Sammelgebiet und Sammelzeitpunkt, als auch auf das Entwicklungsstadium der getesteten Zecken (Tab. 3.11. und Abb. 3.18.).

Entsprechend dem Entwicklungsstadium der Zecken nahm die Prävalenz der Borrelien von Larven 4,7 % (4 von 85) über Nymphen 10,8 % (33 von 306) zu adulten Zecken 21,7 % (30 von 138) zu. Damit war die Infektionsrate der adulten Zecken signifikant höher als die von Larven und Nymphen ($p=0,001$ bzw. $p=0,004$; Chi-Quadrat-Test).

Es zeigten sich erhebliche lokale Unterschiede in der Borrelien-Durchseuchung der Zecken. Die Bandbreite lag zwischen 5 und 26 %: 5 % (12 von 227) im Gebiet Bad Tölz I, 9 % (8 von 90) in EG2-2001, 15 % (11 von 71) in EG2-2000, 25 % (28 von 110) in EG1-2000 und 26 % (8 von 31) in EG1-2002. Damit war bei den im Jahr 2000 gesammelten Zecken die Gesamtinfektionsrate in den Gebieten EG1-2000 und EG2-2000 signifikant höher als im Gebiet Bad Tölz 1 ($p=0,0000002$ bzw. $p=0,01$; Chi-Quadrat-Test). Die Prävalenzraten in den einzelnen Sammelgebieten wurden auch für die verschiedenen Entwicklungsstadien getrennt ausgewertet. Hierbei ergaben sich sowohl für Nymphen ($p=0,002$; Chi-Quadrat-Test), als auch für Adulte ($p=0,014$; Chi-Quadrat-Test) eine signifikant höhere Prävalenz im Gebiet EG1-2000 im Vergleich zu Bad Tölz 1. Der Unterschied zwischen EG2-2000 und Bad Tölz-2000 war nach Entwicklungsstadium getrennt betrachtet nicht signifikant ($p=0,22$ (Nymphen) bzw. $p=0,21$ (Adulte); Fisher-exact-Test).

Die höhere Durchseuchungsrate der Zecken in den Gebieten EG1 und EG2 im Vergleich zu Bad Tölz spiegelt sich jedoch nicht in der anti-*B. burgdorferi*-Antikörperprävalenz der Bevölkerung in den entsprechenden Gebieten wider [152]. Hier besteht eine umgekehrte Situation - mit einer höheren Prävalenz in der Bevölkerung von Bad Bad Tölz im Vergleich zu Münchner Bürgern.

Die Infektionsraten der Zecken in den gleichen Gebieten zu verschiedenen Sammelzeitpunkten unterschieden sich nur geringfügig. Mit 26 % (Jahr 2002) und 25 % (Jahr 2000) im Sammelgebiet EG1 bzw. 9 % (Jahr 2001) und 15 % (Jahr 2000) im Gebiet EG2 waren die Veränderungen der Prävalenzraten nicht signifikant.

Tab. 3.11.: Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. für die verschiedenen Sammelgebiete. Doppelinfektionen (siehe auch Tab. 3.12.) sind in den Angaben nicht berücksichtigt.

+	Larven			Nymphen			Adulte			alle Stadien		
	n	positiv	(%)	n	positiv	(%)	n	positiv	(%)	n	positiv	(%)
EG1-2000	22	3	(14)	64	15	(23)	24	10	(42)	110	28	(25,5)
EG1-2002	-	-	-	-	-	-	31	8	(26)	31	8	(25,8)
EG2-2000	-	-	-	45	6	(13)	26	5	(19)	71	11	(15,5)
EG2-2001	-	-	-	53	2	(4)	37	6	(16)	90	8	(8,9)
Bad Tölz	63	1	(2)	144	10	(7)	20	1	(5)	227	12	(5,2)
gesamt	85	4	(4,7)	306	33	(10,8)	138	30	(21,7)	529	67	(12,7)

n = Anzahl der untersuchten Zecken; 2000, 2001, 2002 = Sammelzeitpunkte

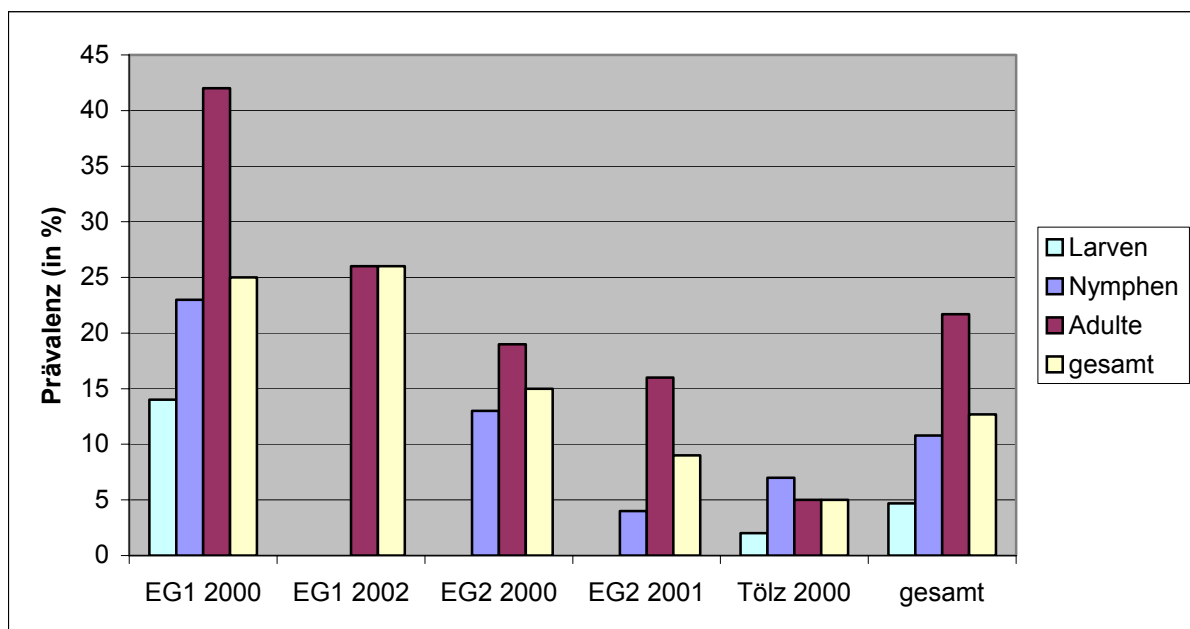


Abb. 3.18.: Darstellung der Borrelien-Prävalenz (in %) in den verschiedenen Sammelgebieten (Sammelzeitpunkte 2000, 2001, 2002) aufgeteilt nach Entwicklungsstadien der getesteten Zecken (für Zahlenangaben siehe Tab 3.11.).

III.6.2. Spezies-Differenzierung der detektierten Borrelien

Alle Amplifikate der *ospA*-PCR aus Zecken wurden zur Bestimmung von Borrelien-Spezies und *OspA*-Typ mittels RFLP analysiert (siehe Anhang 3). Der Vergleich der erhaltenen Schnittbilder mit denen der Referenzstämmen erlaubte eine Zuordnung zu den verschiedenen Spezies.

Die am häufigsten gefundene Spezies war *B. garinii* mit 61 % (44 von 72), gefolgt von *B. afzelii* mit 25 % (18 von 72) und *B. burgdorferi* s.s. mit 11 % (8 von 72). Eine *B. valaisiana* (1 %) wurde im Gebiet EG1-2000 gefunden, *B. lusitaniae* war nicht detektierbar (Abb.

3.19.). Das RFLP-Schnittmuster einer Borrelie ließ sich nach Sequenzanalyse dem Typ *Borrelia* A14S [197] zuordnen (Kap III.5.).

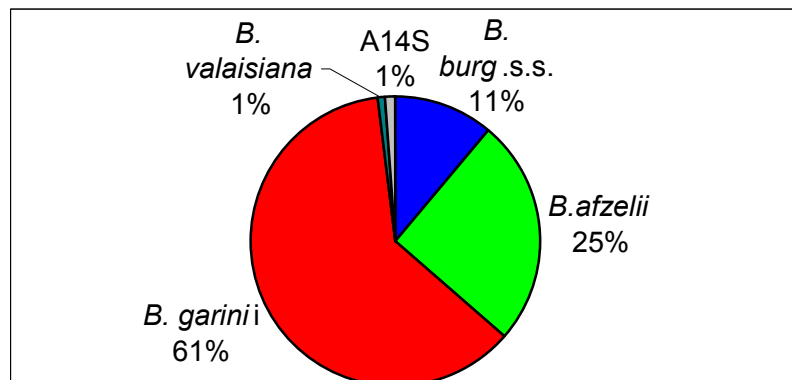


Abb. 3.19.: Anteil der verschiedenen Borrelien-Spezies in allen Gebieten (in Prozent).

Lokale Variationen der gefundenen Borrelien-Spezies (Tab. 3.12., Abb. 3.20.):

Mit 0 – 14 % war der Anteil von *B. burgdorferi* s.s. in allen Gebieten konstant niedrig und zeigte wenig lokale Variationen. Die Häufigkeit von *B. afzelii* hingegen hatte mit Werten zwischen 0 und 63 % der positiven Zecken eine größere Bandbreite. Signifikant höher war das lokale Vorkommen dieser Spezies im Gebiet Bad Tölz (2000) im Vergleich zu den Gebieten im Englischen Garten (2000): EG1-2000 (7 %) vs. Bad Tölz (50 %) ($p = 0,002$; Fisher exact Test), EG2-2000 (0 %) vs. Bad Tölz (50 %) ($p = 0,006$; Fisher exact Test).

Der Anteil von *B. garinii* erwies sich mit 25 – 91 % (je nach Gebiet) ebenfalls als variabel. Die Häufigkeit dieser Spezies war im Englischen Garten (2000) signifikant höher als in Bad Bad Tölz (2000): EG1-2000 (80 %) vs. Bad Tölz (36 %) ($p = 0,007$; Fisher exact Test), EG2-2000 (91 %) vs. Bad Tölz (36 %) ($p = 0,005$; Fisher exact Test).

B. valaisiana und *Borrelia* A14S kamen jeweils nur in einem Gebiet vor.

Variabilität der Speziesverteilung über die Zeit (Tab. 3.12., Abb. 3.20.):

In den Gebieten im Englischen Garten wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Zecken gesammelt um die Veränderung der Borrelienpopulationen über die Zeit zu untersuchen. Für beide Gebiete ergaben sich zu beiden Zeitpunkten signifikant unterschiedliche Häufigkeiten - sowohl für den Anteil von *B. afzelii*, als auch für den von *B. garinii*:

B. afzelii: EG1-2000 (7 %) vs. EG1-2002 (63 %) ($p=0,002$; Fisher exact Test) und EG2-2000 (0 %) vs. EG2-2001 (50 %) ($p=0,014$; Fisher exact Test).

B. garinii: EG1-2000 (80 %) vs. EG1-2002 (26 %) ($p=0,007$; Fisher exact Test) und EG2-2000 (91 %) vs. EG2-2001 (25 %) ($p=0,004$; Fisher exact Test).

Tab. 3.12.: Verteilung von Spezies und OspA-Typen der in den Zecken detektierten Borrelien, aufgeführt nach Sammelort und Sammelzeitpunkt.

Spezies	OspA-Typ	EG1-2000		EG1-2002		EG2-2000		EG2-2001		Bad Tölz		alle Gebiete		
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	95 % KI
<i>B. burg.s.s.</i>	1	4	13	-	-	1	8	1	13	2	14	8	11	4,9 – 20,7
<i>B. afzelii</i>	2	2	7	5	63	-	-	4	50	7	50	18	25	15,5 – 36,6
<i>B. garinii</i>	div.	24	80	2	25	11	92	2	25	5	36	44	61	48,9 – 72,4
	3	-	-	1	13	-	-	-	-	-	-	1	1	0,04 – 7,5
	4	14	47	-	-	1	8	1	13	-	-	16	22	13,3 – 33,6
	5	-	-	-	-	4	33	-	-	-	-	4	6	1,5 – 13,6
	6	10	33	1	13	6	50	1	13	5	36	23	32	21,4 – 44,0
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. valaisiana</i>		-	-	1	13	-	-	-	-	-	-	1	1	0,04 – 7,5
A14S		-	-	-	-	-	-	1	13	-	-	1	1	0,04 – 7,5
gesamt		30	100	8	100	12	100	8	100	14	100	72	100	

Die gefundenen Doppelinfektionen in den Gebieten EG1-2000 (OspA-Typ 4 + 6 und 1 + 4), EG2-2000 (OspA-Typ 1 + 4) und Bad Tölz (OspA-Typ 1 + 2 und 2 + 6) sind in den Häufigkeitsangaben integriert. 95 % KI = 95 % Konfidenzintervall.

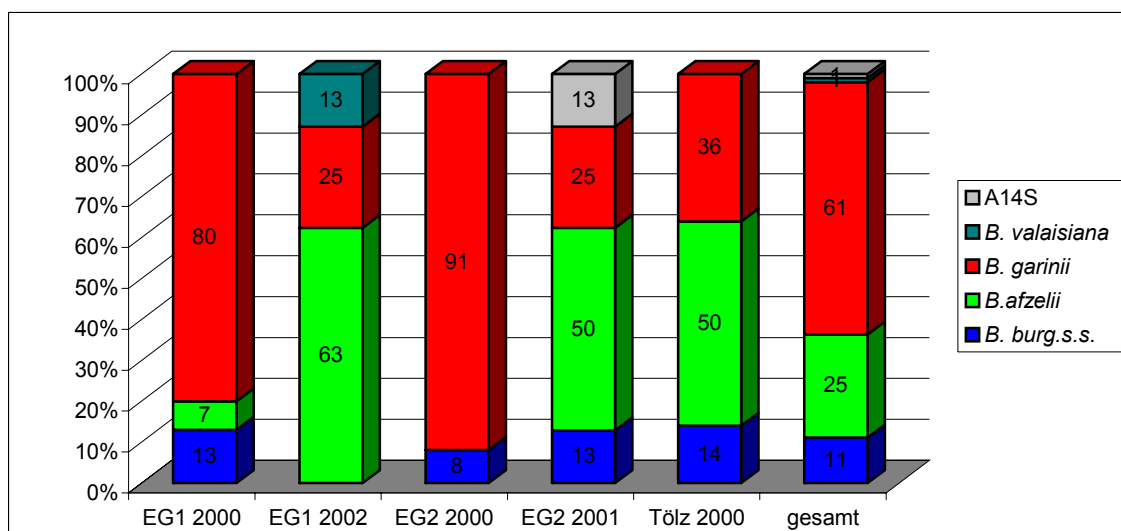


Abb. 3.20.: Häufigkeit der Spezies insgesamt und aufgeteilt nach Sammelgebieten und -zeitpunkten, angegeben in Prozent der positiven Zecken (Anzahl siehe Tab 3.12.).

III.6.3. OspA-Subtypisierung von *Borrelia garinii*

Die OspA-Typisierung der Borrelien mittels Restriktionsenzymverdau erlaubte, zusätzlich zur Speziesdifferenzierung, auch eine Analyse der Verteilung der verschiedenen OspA-Typen

von *B. garinii*. Unter den gefundenen *B. garinii* (OspA-Typen 3-7) war OspA-Typ 6 mit 52 % (23 von 44) am häufigsten, gefolgt von OspA-Typ 4 mit 36 % (16 von 44). Seltener waren OspA-Typ 5 mit 9 % (4 von 44) und OspA-Typ 3 mit 2 % (1 von 44) der gefundenen *B. garinii*. OspA-Typ 7 konnte in keinem Gebiet detektiert werden (Abb. 3.21., Tab. 3.12.).

Verteilung der Subtypen von *B. garinii* in den verschiedenen Gebieten:

Bei den im Jahr 2000 gesammelten Zecken ergaben sich für den Anteil von OspA-Typ 6 (zwischen 33 % in EG1-2000 und 50 % in EG2-2000) keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gebieten.

Die Verteilung von OspA-Typ 4 hingegen zeigte große lokale Differenzen und im Gebiet EG1-2000 eine fokale Häufung mit einem Anteil von 47 % (14 von 30) aller gefundenen Borrelien. Im Vergleich dazu war der Anteil dieses Typs in den Gebieten EG2-2000 mit 8 % (1 von 12) bzw. Bad Tölz mit 0 % (0 von 14) signifikant niedriger ($p = 0,03$; Fisher exact Test bzw. $p = 0,002$; Fisher exact Test).

Ebenso fokal war das Auftreten von OspA-Typ 5 mit 33 % (4 von 12) der gefundenen Borrelien im Gebiet EG2-2000. Dieser Subtyp ließ sich in keinem anderen Gebiet detektieren. Damit war der Anteil im Gebiet EG2-2000 signifikant höher als in den Gebieten EG1-2000 ($p = 0,004$; Fisher exact Test) und Bad Tölz ($p = 0,03$; Fisher exact Test).

Variabilität der *B. garinii* OspA-Typen-Verteilung über die Zeit:

Die Häufigkeit der verschiedenen *B. garinii* OspA-Typen in den Gebieten wurde auch auf ihre Veränderung über die Zeit analysiert. Für die Häufigkeit von OspA-Typ 4 der Spezies *B. garinii* ergaben sich im Gebiet EG1 signifikante Veränderungen: OspA-Typ 4 war im Jahr 2000 mit einem Anteil von 47 % (14 von 30) signifikant häufiger als bei den im selben Gebiet im Jahr 2002 (0 %; 0 von 8) positiven Zecken ($p = 0,02$; Fisher exact Test).

Der Anteil von OspA-Typ 5 an den Borrelien aus dem Gebiet EG2 erwies sich im Jahr 2000 mit 33 % (4 von 12) deutlich höher als mit 0 % (0 von 8) im Jahr 2001. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p = 0,12$; Fisher exact Test).

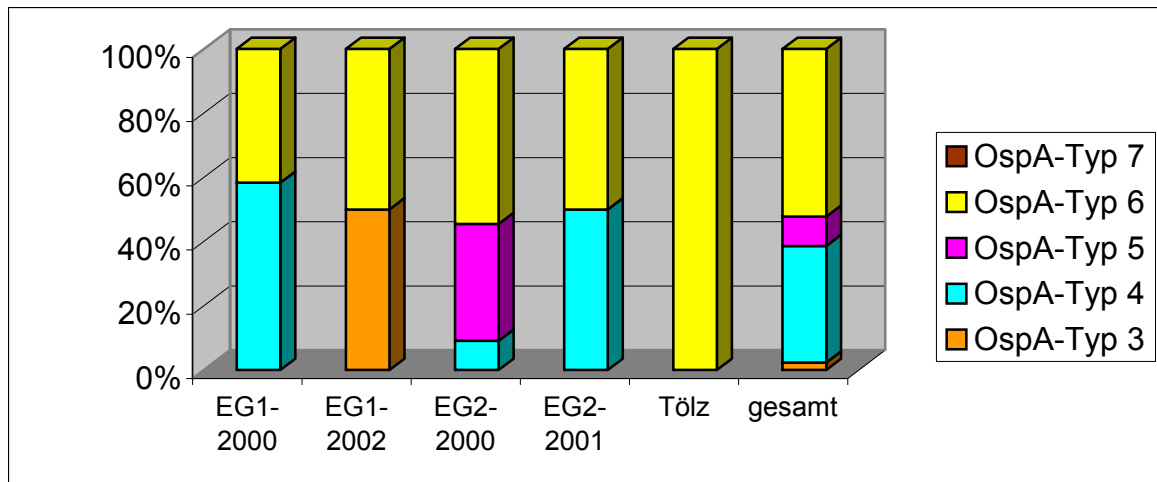


Abb. 3.21.: Zuordnung der gefundenen *B. garinii* zu den OspA-Typen 3 bis 7 getrennt nach Sammelgebieten und -zeitpunkten.

III.6.4. Doppelinfektionen

In fünf der insgesamt 67 positiven Zecken (7,5 %) wurde eine Mischinfektion mit je zwei verschiedenen Borrelien-Typen detektiert (Tab. 3.12.). Dabei ergaben sich zwei Koinfektionen mit den Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* (je OspA-Typen 1+4), und je eine mit der Kombination *B. burgdorferi* s.s. mit *B. afzelii* (OspA-Typen 1+2) und *B. afzelii* mit *B. garinii* (OspA-Typen 2+6). Die fünfte Doppelinfektion bestand aus *B. garinii* OspA-Typ 4 und 6. Es war keine Häufung bestimmter Kombinationen von Borrelien zu finden.

III.7. Differenzierung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in klinischem Material

III.7.1. Borrelienkulturen

In einer explorativen Studie wurden insgesamt 59 in München aus klinischem Material isolierte *B. burgdorferi* s.l. Stämme typisiert und die Verteilung der verschiedenen Spezies und OspA-Typen bestimmt. Darunter waren 40 Liquorisolat (s. Anhang 4) von Patienten mit Neuroborreliose, 18 Hautisolate von Patienten mit Erythema migrans (s. Anhang 5) und ein Isolat aus einem Kniegelenkspunktat von einem Patienten mit Lyme-Arthritis. Alle Isolate wurden mit RFLP-Analyse und Multiplex-PCR differenziert. Zusätzlich erfolgte bei 51 Proben eine Typisierung mit dem LightCycler im Hyb-Probes-Format. Bei 39 Liquorisolaten und 17 EM-Isolaten wurde zusätzlich eine Sequenzanalyse durchgeführt. Tabellen zu den Typisierungen der einzelnen Isolate finden sich in Anhang 4 und 5.

Liquorisolate:

Unter den 40 typisierten Liquorisolaten stimmten bei 39 alle Typisierungsmethoden überein. Bei PGeb stimmten die Ergebnisse der RFLP-Analyse, Multiplex-PCR und Sequenzanalyse nicht überein. Aufgrund der Sequenzanalyse konnte PGeb *B. bissetii* zugeordnet werden (siehe Kap 3.5.).

Für zwei Kulturen ergab die RFLP-Analyse eine Mischinfektion. Während bei PMel (OspA-Typ 2+4+6) mit der Sequenzierung nur der OspA-Typ 4 detektiert werden konnte, war es bei PKuf (OspA-Typ 1+7) möglich mit mehreren Sequenzierungsläufen ebenfalls die Mischinfektion nachzuweisen.

Die am häufigsten gefundene Spezies unter den Liquorisolaten war *B. burgdorferi* s.s. mit 37,5 % (15 der 40 Isolate) gefolgt von *B. garinii* mit 30 % (12 von 40) und *B. afzelii* mit 25 % (10 von 40) (Tab. 3.13., Abb. 3.22.). Unter Annahme einer repräsentativen Stichprobe wurde für diese Werte jeweils das 95 %-Konfidenzintervall berechnet (Tab. 3.13.).

Die detektierten *B. garinii* wurden weiter in die OspA-Typen 3 bis 7 differenziert. Am häufigsten war OspA-Typ 6 mit 67 % (8 von 12). Dies entspricht einem Anteil von 20 % an allen Liquorisolaten. Dem folgte OspA-Typ 4 mit 17 % (2 von 12) und OspA-Typ 3 und 5 mit je 8 % (1 von 12) Anteil an *B. garinii* (Tab. 3.13., Abb. 3.22.). OspA-Typ 7 wurde in einer Mischkultur gefunden (siehe unten).

In zwei Kulturen wurden Mischungen aus zwei bzw. drei Borrelienspezies oder Subtypen detektiert: *B. burgdorferi* s.s. mit *B. garinii* (OspA-Typ 7) in der einen Kultur, und *B. afzelii* gemischt mit zwei Subtypen von *B. garinii* (OspA-Typ 4+6) in der anderen.

Tab. 3.13.: Verteilung der verschiedenen Spezies und OspA-Typen unter 40 getesteten Liquorisolaten.

Spezies	OspA-Typ	n (von 40)	in Prozent	95 %-Konfidenzintervall*
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	15	37,5	22,5 - 54,2
<i>B. afzelii</i>	2	10	25	12,7 - 41,2
<i>B. garinii</i>	div.	12	30	16,6 - 46,5
	3	1	2,5	0,06 - 13,2
	4	2	5	0,6 - 16,9
	5	1	2,5	0,06 - 13,2
	6	8	20	9,1 - 35,7
	7	-	0	0
<i>B. bissetii</i>	-	1	2,5	0,06 - 13,2
Mischkulturen	-	2		

* Unter Annahme einer repräsentativen Stichprobe ist jeweils das 95 %-Konfidenzintervall angegeben.

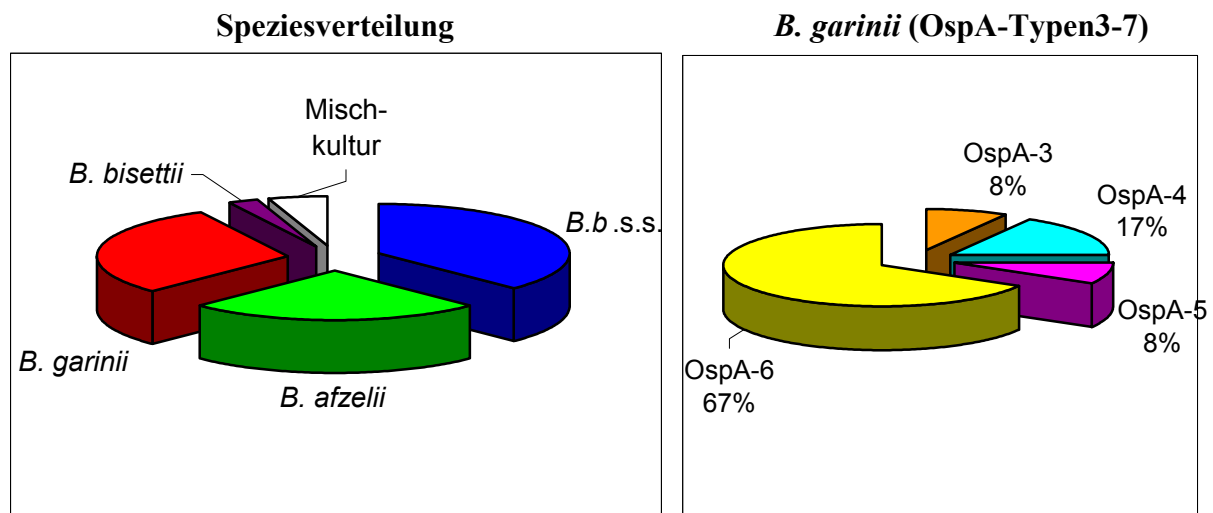


Abb. 3.22.: Die Darstellung zeigt die Verteilung der Spezies *B. burgdorferi* s.s. (*B.b.s.s.*), *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. bissettii* unter 40 getesteten Liquorisolaten und die weitere Differenzierung der gefundenen *B. garinii* in die OspA-Typen 3-7.

In einer zusammenfassenden Auswertung wurden alle 66 im Zeitraum von 1984 bis 2002 am Max v. Pettenkofer Institut typisierten Liquorisolat (siehe Anhang 7) betrachtet. Dabei war die am häufigsten vorkommende Spezies *B. garinii* (48 %) gefolgt von *B. burgdorferi* s.s. (24 %) und *B. afzelii* (23 %) (Tab 3.14., Abb. 3.23.).

Bei der Auswertung der OspA-Typen-Verteilung von *B. garinii* wurden die Daten nach Patientenalter in pädiatrische (unter 18 Jahre) und nicht pädiatrische Patienten (über 18 Jahre) differenziert. Während bei den nicht pädiatrischen Patienten OspA-Typ 4 am häufigsten war, zeigte sich bei den pädiatrischen Patienten eine deutliche Dominanz von OspA-Typ 6 (Tab 3.14., Abb. 3.23.).

Tab. 3.14.: Verteilung der verschiedenen Spezies und OspA-Typen unter den 66 im Zeitraum von 1984 bis 2002 am Max v. Pettenkofer Institut differenzierten Liquorisolaten.

Spezies	OspA-Typ	n (von 66)	in Prozent	95 %-Konfidenzintervall*
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	16	24	14,6 - 36,4
<i>B. afzelii</i>	2	15	23	13,3 - 34,7
<i>B. garinii</i>	div.	32	48	36,0 - 61,1
	3	4	6	1,7 - 14,8
	4	12	18	9,8 - 29,7
	5	2	3	0,4 - 10,5
	6	10	15	7,5 - 26,1
	7	2	3	0,4 - 10,5
	8	2	3	0,4 - 10,5
<i>B. bissettii</i>	-	1	2	0,0 - 8,2
Mischkulturen	-	2	3	0,4 - 10,5

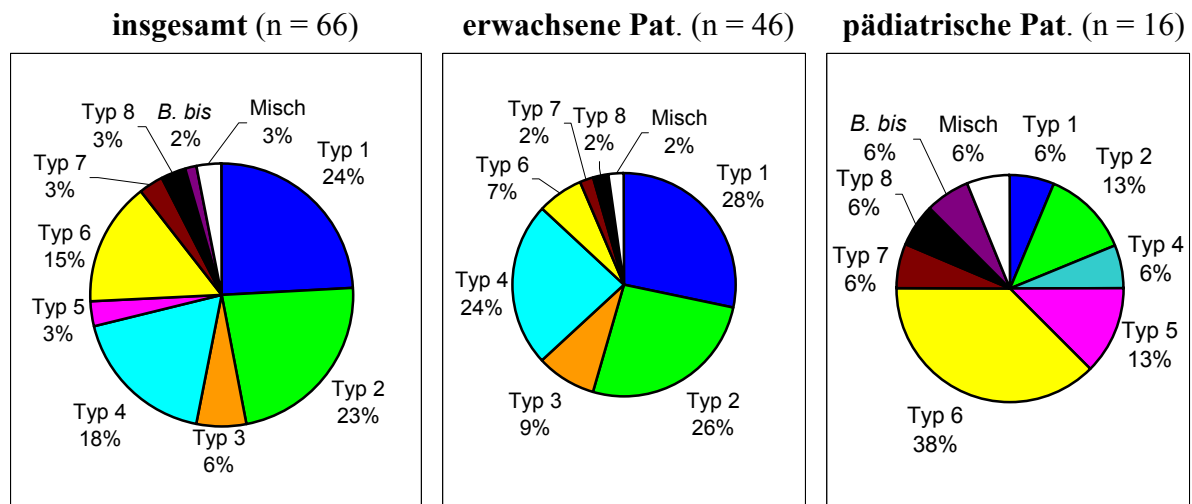


Abb. 3.23.: Die Darstellung zeigt die Verteilung der Spezies und OspA-Typen 1 bis 8 aller 66 im Zeitraum von 1984 bis 2002 am Max v. Pettenkofer Institut typisierten Liquorisolaten. Im Weiteren ist der Unterschied zwischen pädiatrischen (unter 18 Jahre) und nicht pädiatrischen (über 18 Jahre) Patienten (Pat.) dargestellt. *B. bis* = *Borrelia bissetii*.

Hautisolat:

Bei allen 18 getesteten Stämmen stimmten die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Typisierungsmethoden überein. Die am häufigsten gefundene Spezies unter den EM-Isolaten war *B. afzelii* mit 78 % (14 von 18 Isolaten). Mit 22 % (4 von 18 Isolaten) war die Anzahl der gefundenen *B. garinii* deutlich geringer (Tab. 3.15., Abb. 3.24.). *B. burgdorferi* s.s. und andere *Borrelia*-Spezies konnten nicht detektiert werden.

Die gefundenen *B. garinii* wurden weiter in die OspA-Typen 3 bis 7 differenziert. Mit 50 % (2 von 4) der *B. garinii* war OspA-Typ 6 am häufigsten zu finden. Dies entspricht einem Anteil von 11 % (2 von 18) an allen EM-Isolaten. Bei je einem Hautisolat (je 6 % aller EM-Isolate) ergab die Differenzierung die OspA-Typen 3 und 5. In keiner EM-Kultur konnten die OspA-Typen 4 oder 7 detektiert werden (Tab. 3.15., Abb. 3.24.).

Tab. 3.15.: Verteilung der verschiedenen Spezies und OspA-Typen unter den Hautisolaten von Patienten mit Erythema migrans.

Spezies	OspA-Typ	n (von 18)	in Prozent	95 %-Konfidenzintervall
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	-	-	-
<i>B. afzelii</i>	2	14	78	52,4 – 93,6
<i>B. garinii</i>	div.	4	22	6,4 -47,6
	3	1	6	0,1 - 27,3
	4	-	-	-
	5	1	6	0,1 - 27,3
	6	2	11	1,4 - 34,7
	7	-	-	-

* Unter Annahme einer repräsentativen Stichprobe sind die 95 %-Konfidenzintervalle angegeben.

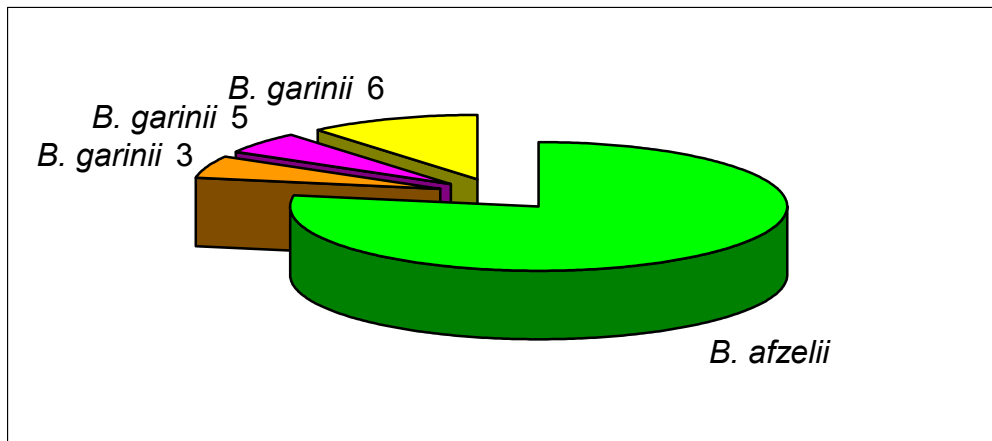


Abb. 3.24.: Verteilung von *B. garinii* und *B. afzelii* unter den 18 getesteten EM-Isolaten. Die *B. garinii* werden dabei noch weiter in die OspA-Typen 3 bis 7 (*B. garinii* 3, 5, 6) differenziert.

Kniegelenkspunktat:

Die Differenzierung der aus einem Kniegelenkspunktat gewonnenen Kultur ergab sowohl mittels RFLP-Analyse, als auch mit LightCyler, Multiplex-PCR und Sequenzanalyse eine *B. burgdorferi* s.s..

Beim Vergleich der Verteilung der *Borrelia*-Spezies in den Liquorisolaten mit derjenigen in den Hautisolaten ergaben sich signifikante Unterschiede für *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*. Während *B. burgdorferi* s.s. in den Liquorisolaten mit 37,5 % signifikant häufiger zu finden war als mit 0 % in den Hautisolaten ($p = 0,002$; Fisher-exact-Test), sahen die Verhältnisse bei *B. afzelii* umgekehrt aus: 78 % in den Haut- und 25 % in den Liquorisolaten ($p = 0,0002$; Chi-Quadrat Test). Bei *B. garinii* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung.

III.7.2. Direkte Untersuchung von Patientenmaterial

Insgesamt wurden 20 Patienten-Direktmaterialien differenziert, die sich in der Routine-PCR des Max v. Pettenkofer-Instituts als *B. burgdorferi* s.l. positiv herausgestellt hatten. Darunter waren 13 Hautbiopsien von Patienten mit kutanen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose: sieben Erythema migrans Patienten, drei Patienten mit Akrodermatitis chronica atrophicans und drei mit atypischen kutanen Manifestationen. Außerdem wurden drei Liquorpunktate von Patienten mit Neuroborreliose und drei Gelenkspunktate von Patienten mit arthritischen Verlaufsformen untersucht. Eine Probe stammte aus einer Fruchtwasserentnahme von einer schwangeren Patientin mit Lyme-Borreliose. Eine Tabelle zu den Typisierungen der einzelnen Direktmaterialien findet sich in Anhang 6.

Alle Proben wurden mittels RFLP-Analyse und Sequenzierung typisiert, elf zusätzlich mit der Multiplex-PCR getestet. Bei allen Proben bis auf P1771 stimmten die Ergebnisse aller Methoden zur Typisierung überein. P1771 wurde aufgrund der *ospA*-Sequenzanalyse als *B. garinii* OspA-Typ 8 gewertet (siehe Kap. 3.5.).

Die Speziesdifferenzierung ergab mit 50 % (10 von 20) der Proben am häufigsten die Spezies *B. afzelii* gefolgt von *B. garinii* mit 30 % (6 von 20). *B. burgdorferi* s.s. wurde in 20 % (4 von 20) der Proben detektiert (Tab. 3.16.; Abb. 3.25.). Andere *Borrelia*-Spezies waren nicht vertreten. Die sechs gefundenen *B. garinii* wurden weiter in die OspA-Typen 3 bis 7 differenziert. Bei 83 % (5 von 6) davon ergab sich der OspA-Typ 4. Dies entspricht einem Anteil von 25 % (5 von 20) aller Proben. Eine *B. garinii* war dem OspA-Typ 8 zuzuordnen.

Tab. 3.16.: Speziesverteilung der Borrelien in 20 untersuchten Direktmaterialien.

Spezies	OspA-Typ	n (von 20**)	in Prozent	95 %-Konfidenzintervall*
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1	4	20	5,7 - 43,7
<i>B. afzelii</i>	2	10	50	27,2 - 72,8
<i>B. garinii</i>	div	6	30	11,9 - 54,3
	3	-	-	-
	4	5	25	8,7 - 49,1
	5	-	-	-
	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	1	5	0,1 - 24,9

* Unter Annahme einer repräsentativen Stichprobe wurde das 95 %-Konfidenzintervall berechnet.

**13 Hautbiopsien, 3 Liquorpunktate, 3 Kniegelenkpunktate und eine Fruchtwasserprobe

Die Proben der Patienten mit kutanen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose wurden nochmals gesondert ausgewertet. Bei dieser Gruppe war *B. afzelii* mit 54 % (7 von 13) der Fälle am häufigsten, gefolgt von *B. garinii* mit 38 % (5 von 13). Bei einer Probe (8 %) ergab die Differenzierung eine *B. burgdorferi* s.s.. Alle detektierten *B. garinii* gehörten zum OspA-Typ 4. Damit war der Anteil von *B. garinii* OspA-Typ 4 im Direktmaterial der Patienten mit kutanen Manifestationsformen signifikant höher als in den Isolaten der Patienten mit Erythema migrans ($p = 0,008$, Fisher exact Test).

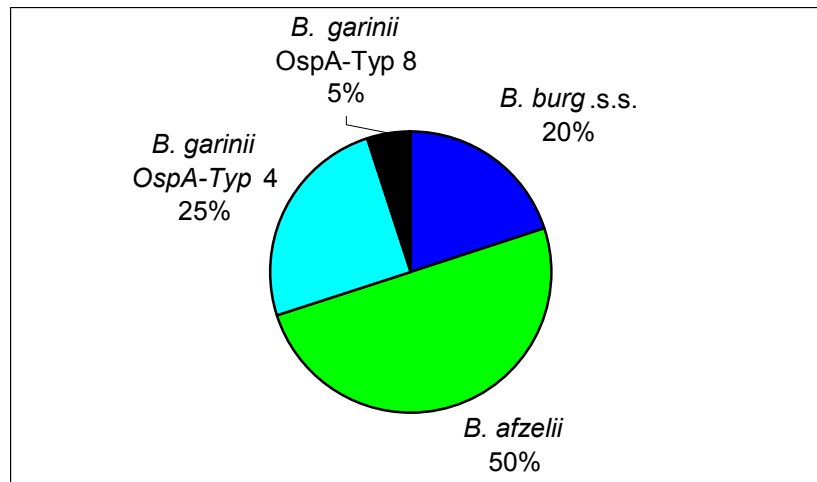


Abb. 3.25.: Die Darstellung zeigt die Verteilung der Spezies und OspA-Typen in den 20 untersuchten Direktmaterialien.

Bei den drei Liquorproben ergab die Differenzierung je einmal *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* OspA-Typ 8. In zwei der drei Kniegelenkspunktate wurde je eine *B. afzelii* gefunden, in dem dritten eine *B. burgdorferi* s.s.. Für die Fruchtwasserprobe ergab die Differenzierung ebenfalls eine *B. burgdorferi* s.s..

IV. Diskussion

IV.1. *ospA*-PCR

Die PCR ist eine häufig verwendete Methode für den Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. in epidemiologischen und klinischen Studien. Ihre Vorteile sind die schnelle Durchführbarkeit, sowie die prinzipiell hohe Sensitivität und Spezifität der Detektion [171]. Obwohl sie noch nicht standardisiert genug für den Einsatz in der Routinediagnostik der Lyme-Borreliose ist, kann sie in Einzelfällen als wichtige Spezialuntersuchung diagnostische Hilfe bieten; vor allem bei atypischen Frühmanifestationen der Krankheit (z.B. atypisches Erythema migrans) [205]. Unter den mehr als 100 bisherigen Borrelien-PCR-Publikationen stellt das plasmidkodierte *ospA*-Gen mit über 20 verschiedenen Protokollen ein häufig verwendetes Zielgen dar [171]. Ein Grund dafür könnte die diskutierte Überrepräsentation von plasmidkodierten Genen im Vergleich zu chromosomalen Genen sein und damit eine mögliche Erhöhung der PCR-Sensitivität [128]. Es existieren allerdings wenige publizierte direkte Vergleiche verschiedener PCR-Protokolle [171]. Wichtigste Aspekte bei der Auswahl von Target und Primer für die Entwicklung einer PCR sind die Sensitivität und die Spezifität der Amplifikation. Da bisher veröffentlichte PCR-Protokolle oft nur unzureichend evaluiert sind (siehe unten) oder sich z. B. nur für Borrelienkulturen eignen [191] sollte eine PCR zum sensitiven und spezifischen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. in Kulturen und Direktmaterialien entwickelt werden.

Die sensitive Erfassung durch die PCR sollte für alle pathogenen Subtypen von *B. burgdorferi* s.l. möglichst gleichermaßen sichergestellt sein [171]. In Europa sind dabei vor allem die nachgewiesenen humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* relevant [16], sowie die in Zecken prävalenten Spezies *B. valaisana* und *B. lusitaniae*. Da *B. valaisiana*-DNA mit PCR in Hautbiopsien von Patienten mit Erythema migrans nachgewiesen werden konnte, wird auch für diese Spezies eine Humanpathogenität zumindest vermutet [157]. Im weiteren sollte auch der neue Genotyp *Borrelia* A14S erfasst werden da dieser in neueren Studien häufiger als bisher beschrieben aus Haut isoliert werden konnte (Fingerle u. Wilske et al nicht publiziert). Eine gleichmäßig sensitive Detektion der einzelnen Subtypen ist insbesondere bei nachfolgender Differenzierung des PCR-Produkts von Bedeutung, um Verfälschungen der Daten durch Sensitivitätsunterschiede bei der Detektion zu vermeiden. Dies kann jedoch vor allem durch die Heterogenität des PCR-Zielgens kompliziert werden. Das *ospA*-Gen von Stämmen der Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* ist jeweils sehr homogen (98,5 –100 % Übereinstimmung) [204]. Innerhalb der Spezies *B. garinii* zeigt sich

jedoch eine ausgeprägte Heterogenität (79,6-100 % Übereinstimmung), wobei sich, entsprechend den OspA-Typen von *B. garinii* [215], homogene Gruppen bilden lassen [204]. Ausgangspunkt bei der Entwicklung der vorliegenden *ospA*-PCR war das Protokoll von Trebesius et al. [191] zur Amplifizierung von Kulturborrelien. Durch Primeranalyse mit einem DNA Sequenz-Alignment, Modifikation und Hinzunahme neuer Primer sowie Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte die Detektion für vier der relevanten *Borrelia* Subtypen entscheidend verbessert werden. Nachfolgend war, jeweils getrennt für die Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* sowie für alle 5 OspA-Typen von *B. garinii*, eine hohe Sensitivität der PCR nachweisbar. Die Notwendigkeit dieser, innerhalb der Spezies *B. garinii* in die OspA-Typen aufgesplitterten Sensitivitätsevaluierung, zeigte sich unter anderem in folgender Tatsache: Trotz einer guten Amplifikation der *B. garinii* OspA-Typen 4, 5 und 6 mit dem reverse-Primer R1 war der sensitive Nachweis von *B. garinii* OspA-Typ 3 und 7 nur mit dem zusätzlichen reverse-Primer R37 zu erreichen. In den meisten bisher veröffentlichten *ospA*-PCR Protokollen erfolgte eine Evaluierung der Sensitivität nur für 1 bis 2 verschiedene *B. garinii* Stämme [84;97;98;149;151;157]. In Anbetracht der Heterogenität von *B. garinii* [204] und den vorliegenden Ergebnissen zufolge reicht dies nicht aus, um von einer gleichmäßig sensitiven Amplifikation aller *B. garinii* Subtypen auszugehen. Die Spezifität einer PCR garantiert einerseits die Amplifikation mit den spezifischen Primern selbst, andererseits eine weitere Spezifizierung des Amplifikationsprodukts durch Anschlussverfahren wie z.B. RFLP, Sequenzierung oder Hybridisierung. In der vorliegenden Arbeit wurde eine (hemi)nested-PCR durchgeführt. Dies erhöht neben der Sensitivität vor allem die Spezifität der Amplifikation, da zwei Sets spezifischer Primer benutzt werden [66;119]. Während man nach Meinung mancher Autoren damit auf eine weitere Spezifizierung des PCR-Produkts verzichten kann [224], wurde diese bei den entwickelten Protokollen mittels RFLP-Analyse und Hybridisierung mit Hyb-Probes durchgeführt. Lediglich bei der Multiplex-PCR kam nur die nested-Amplifikation mit den verschiedenen resultierenden DNA-Fragment-Längen zur Spezifizierung zur Verwendung. Trotz aller Maßnahmen zur Verbesserung der Spezifität einer PCR muss diese bei der Etablierung eines Protokolls immer mit nah verwandten Bakterien auch experimentell nachgewiesen werden [171]. Keiner von sieben Rückfallfieber-Borrelien-Stämmen, acht *Leptospira*-Serovaren und zwei *Treponema* spp. war in dem vorliegenden PCR-Protokoll reaktiv, was für eine hohe Spezifität der Reaktion für den *B. burgdorferi* s.l.-Komplex spricht.

Die PCR bietet den Vorteil einer sensitiven und spezifischen Detektion von DNA innerhalb kurzer Zeit. Allerdings birgt sie eine erhebliche Kontaminationsgefahr, vor allem bei

Protokollen, die auf optimale Sensitivität ausgelegt sind [171]. Dies gilt besonders für die nested-PCR, wo Kontaminationen vor allem während dem Übertrag von DNA aus der ersten Amplifikationsrunde in den nested-Reaktionsansatz stattfinden. Solche Verunreinigungen können zwar durch striktes Befolgen der Regeln von Kwok und Higuchi zur ‚Vermeidung falsch-positiver PCR Ergebnisse‘ minimiert werden [93]. Jedoch bleibt die nested-PCR nach wie vor eine vorwiegend in Speziallabors verwendete Methode [119;171].

IV.2. Typisierung der Borrelien mittels RFLP-Analyse

Die RFLP-Analyse zur Spezifizierung und Differenzierung eines PCR-Amplikons ist schnell und einfach durchführbar. Sie kann ohne langwierige Kultivierung der Borrelien direkt auf Probenmaterial von Zecken oder Patienten angewendet werden und eignet sich somit gut für epidemiologische und populationsgenetische Studien an *B. burgdorferi* s.l. [200]. Die RFLP-Analyse eines Amplikons der *rrf* (5S) - *rrl* (23S) intergenetischen Region mit dem Restriktionsenzym *MseI* ist eine häufig verwendete Methode zur Typisierung von *B. burgdorferi* s.l.[140]. Sie ermöglicht eine zuverlässige Differenzierung auf der Ebene der verschiedenen Genospezies. Der ebenfalls häufig durchgeführte Verdau von 16S-23S rDNA mit dem Enzym *Hinfi* führt zu einer weiteren Subtypisierung innerhalb der Spezies *B. burgdorferi* s.s. [101]. Beide Protokolle ermöglichen jedoch keine weitere Sub-Differenzierung von *B. garinii*. Die Heterogenität von *B. garinii* spielt jedoch in Europa eine erhebliche Rolle bei Erforschung von Pathogenese und Organotropismus sowie der Entwicklung von Impfstoffen und serologischen Testsystemen (Kap. 1.3.2. und 1.7.). Die größte Relevanz hat hier die Einteilung von *B. garinii* in verschiedene *OspA*-Typen. Für diese werden unterschiedliche pathogene Potentiale und Assoziationen zu klinischen Manifestationsformen vermutet [215]. Bisher existieren zur Verteilung dieser Typen allerdings nur sehr begrenzt Daten aus wenigen Regionen [46;215]. Dies liegt möglicherweise auch daran, dass bisher nur aufwendige oder teure Typisierungsverfahren wie Kultivierung und Serotypisierung [215] oder DNA-Sequenzierung [46;204] zur Verfügung stehen.

Der in dieser Arbeit entwickelte Restriktionsverdau des *ospA*-PCR Amplikons mit fünf Restriktionsenzymen erlaubte eine einfache zuverlässige Differenzierung der in Europa relevanten Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Weiter ermöglichte er eine Sub-Differenzierung der Spezies *B. garinii* in fünf Gruppen, entsprechend den von Wilske et al. definierten *OspA*-Typen [215]. Da die *ospA*-Rekombinations- und Austauschrate zwischen verschiedenen Borrelienspezies als sehr niedrig angenommen werden kann [160], ist eine Spezies-Klassifizierung von Stämmen

anhand der *ospA*-Sequenz allgemein akzeptiert und stimmt mit der von konservierteren chromosomalen Genen überein [200]. Der RFLP Verdau stellt somit ein einfaches und schnelles Werkzeug zur Untersuchung der Heterogenität von Borrelien in Europa dar. Anhand von einem DNA Sequenz-Alignment und einer Restriktionsanalyse von 51 *ospA*-Sequenzen wurde der Verdau zusätzlich zur experimentellen Evaluierung analysiert. Dabei ergaben sich theoretische Schnittbildvarianten für die RFLP-Gruppen *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* und *B. garinii* OspA-Typ 7, so dass der Verdau unter Umständen eine weitere Subdifferenzierung dieser Typen erlaubt. Da weder bei den Referenzstämmen noch dem untersuchten Probenmaterial diese Schnittbildvarianten auftraten, bleibt ihre Häufigkeit und Relevanz unklar.

Ein Vorteil der Restriktionsenzymanalyse ist die leichte Detektion und Differenzierung von Mehrfachinfektionen. Infektionen mit mehreren *B. burgdorferi* s.l. Spezies gleichzeitig sind sowohl in Zecken [134;141;155], Reservoirtieren [92;116;117] und Patientenmaterialien [44;102;157] wiederholt beschrieben worden. Die Detektion und Differenzierung solcher Mehrfachinfektionen ist besonders bei Typisierungstechniken, die eine Kultivierung der Borrelien voraussetzt, schwierig. Hier kann es möglicherweise durch Unterschiede im Wachstumsverhalten verschiedener Borrelien in Mischkulturen zum Überwachsen einzelner Typen kommen [64]. Durch unterschiedliche Empfindlichkeit auf Antibiotika, welche bei der Kultivierung eingesetzt werden, können ebenfalls einzelne Typen selektioniert werden [192]. In einer Studie von Liveris et al. wurde aus dem selben klinischen Material eine RFLP-Typisierung mit und ohne vorangegangener Kultivierung der Borrelien zum Vergleich durchgeführt. Die gefundene Rate an Mischinfektionen war bei der direkten Typisierung signifikant höher als nach vorheriger Kultivierung [102]. Um eine gute Detektion von Mehrfachinfektionen mit der RFLP-Analyse zu erreichen, ist eine gleichermaßen sensitive und effektive Amplifikation der verschiedenen Subtypen in der PCR wichtig, da sich Unterschiede aufgrund der exponentiellen Amplifikation in der PCR um ein Vielfaches auf das Ergebnis auswirken. Nach ähnlichem Muster wirken sich auch Unterschiede in der Ausgangskonzentration der einzelnen Borrelientypen aus. Zu große Unterschiede im Mengenverhältnis limitieren deshalb bei dieser Typisierungstechnik die Detektion von multiplen Infektionen. Für das vorliegende Protokoll ließ sich die Grenze des DNA-Mischverhältnisses zweier Stämme, bei dem beide zuverlässig detektiert werden, für verschiedene Spezies-Kombinationen mit 1 / 10 bis 1 / 100 experimentell ermitteln.

Ein Nachteil der RFLP-Typisierung ist, dass trotz umfangreicher Analyse per Sequenz-Alignment und experimenteller Evaluierung Mutationen an den Schnittstellen und somit

Fehltypisierungen nicht völlig auszuschließen sind. Auch können seltene Stämme, die nicht in dem Typisierungsschema berücksichtigt sind, aufgrund gleicher Restriktionsschnittstellen wie Standardstämme dasselbe Schnittmuster haben. Sie bleiben dann unerkannt. So hat *B. garinii* OspA-Typ 8 nach bisherigen Ergebnissen die gleichen Schnittstellen wie OspA-Typ 6. Der OspA-Typ 8 wurde von Wilske et al. [208] für zwei Stämme definiert, die sich mit dem OspA-Serotypisierungssystem keiner der bis dato beschriebenen OspA-Gruppen (1 bis 7) [215] zuordnen ließen. Ebenso wird möglicherweise *B. bissettii* durch die gleichen Schnittstellen wie *B. garinii* OspA-Typ 6 charakterisiert. *B. bissettii* ist jedoch hauptsächlich in Nordamerika prävalent, in Europa ist sie mit bisher nur neun Isolaten aus Slowenien selten [136;188]. Ein Vorteil der Methode ist, dass solche seltenen (Sub-)Typen zwar mit der RFLP Analyse falsch klassifiziert werden, jedoch in der PCR positiv reagieren und somit der Diagnostik nicht entgehen. Falls eine sichere Differentialdiagnose zwischen OspA-Typ 6 und OspA-Typ8 bzw. *B. bissettii* als notwendig erachtet wird sollte eine Sequenzierung der Amplifikate erfolgen.

Interessanterweise ergab der Restriktionsverdau einer positiven Zecken-PCR ein neues, nicht einzuordnendes RFLP-Muster. Wie Sequenzanalyse, Vergleich mit veröffentlichten Sequenzen und Analyse der Restriktionsschnittstellen zeigten, handelt es sich dabei um eine Borrelie, die dem Typ *Borrelia* A14S ähnelt. *Borrelia* A14S ist ein 1999 erstmals beschriebenes genotypisch und phänotypisch neues, europäisches *B. burgdorferi* s.l. Isolat, das eine neue *Borrelia*-Geno-Spezies darstellt [197]. Von einer Humanpathogenität ist auszugehen, da das Isolat aus einer Hautbiopsie von einem Patienten mit Erythema migrans angezüchtet wurde. Auch in Süddeutschland ist das Vorkommen dieses Typs sowohl in Zecken [151] als auch bei einem Patienten mit einem Erythema migrans [55;205] beschrieben worden. Nach den bisherigen Ergebnissen fällt das RFLP-Muster von diesem Borrelientyp im vorgestellten Restriktionsverdau mit dem des *B. valaisiana* Stamms M53 [198] zusammen, so dass eine Speziesdiagnose durch Sequenzierung verifiziert werden muss.

IV.3. Multiplex-PCR

Mit der Multiplex-PCR wurde eine schnelle und sehr einfache Methode zur simultanen Detektion und Differenzierung der klinisch relevanten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* entwickelt. Durch den Einsatz von sieben Primern im nested-Amplifikationsansatz - davon drei Spezies-spezifischen - kann nach Ablauf der PCR anhand der Länge des resultierenden Amplikons die Spezies bestimmt werden. Die Verwendung mehrerer Primersysteme in einer Multiplex-PCR für Nachweis und Differenzierung von DNA

ist ein weit verbreitetes Konzept [30;125;127;162;196;225], da dieses Vorgehen im Vergleich zu konventionellen PCR- und Typisierungsmethoden viel Zeit und Arbeit spart [109]. Bisher existiert jedoch noch kein Multiplex-PCR-Protokoll zur Differenzierung von *B. burgdorferi* s.l. Zwar haben bereits mehrere Autoren eine PCR mit Spezies- bzw. OspA-Typ-spezifischen Primern erfolgreich durchgeführt [106;112;195], in diesen Protokollen wurden die verschiedenen spezifischen Primersets jedoch in mehreren getrennten PCR-Reaktionen eingesetzt, und die Spezies je nach positiver Reaktion bestimmt. Bei der hier vorgestellten Multiplex-PCR hingegen war durch die T_m -Abstimmung der Primer und die deutlichen Längendifferenzen der unterschiedlichen Amplifikate die komplette Amplifikation in einem Reaktionsgefäß möglich. Dabei werden *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. valaisana* aufgrund der kürzeren Amplifikatlänge bevorzugt von den jeweiligen Spezies-spezifischen Primersets amplifiziert. Für *B. garinii* wurde kein spezifischer Primer entwickelt. Damit erfolgte die Amplifikation dieser Spezies mit den im Reaktionsgemisch enthaltenen *B. burgdorferi* s.l. Primern, resultierend in einem längeren Amplifikat. Es konnte eine hohe Sensitivität für die entsprechenden Spezies, und eine hohe Spezifität der Reaktion für *B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen werden. Kreuzamplifikationen der spezifischen Primer, wie sie für andere Spezies-spezifische PCR-Protokolle beschrieben sind [112], waren selbst beim Einsatz hoher Templatekonzentrationen nicht nachzuweisen.

Für die typisierten Borrelien war - basierend auf einer Kontrolle durch DNA-Sequenzierung und RFLP-Analyse - in 99 % der Fälle eine richtige Spezieszuordnung erreichbar. Es konnte also eine hohe Zuverlässigkeit der Multiplex-PCR demonstriert werden. Eine *B. bissettii* wurde mit den *B. burgdorferi* s.l. Primern amplifiziert, und somit als *B. garinii* gewertet. Im Vergleich zu *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisana* spielen andere Spezies in Europa eine untergeordnete Rolle [200]. Der Vorteil des beschriebenen Vorgehens mit Einsatz von *B. burgdorferi* s.l. Primern ist, dass mit diesen auch seltenere Spezies in der PCR amplifiziert und damit detektiert werden. Diese Amplifikate lassen sich dann jedoch nicht nach der Länge von *B. garinii* differenzieren. Bei Materialien, wo vermehrt mit dem Auftreten zusätzlicher Spezies zu rechnen ist, muss deshalb zur Sicherung der Speziesdiagnose *B. garinii* ein Restriktionsenzymverdau des *B. burgdorferi* s.l. Amplifikats durchgeführt werden.

Die beschriebene Vorgehensweise hat aber folgenden Nachteil: Vor allem beim Einsatz großer Mengen von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. valaisana* findet trotz bevorzugter Entstehung der kürzeren Spezies-spezifischen Amplifikate in geringerem Maß auch eine Amplifikation mit den *B. burgdorferi* s.l. Primern statt. Dieser Effekt lässt sich durch

Verdünnung des Amplifikats aus der ersten Runde vor Einsatz in die nested-PCR deutlich verringern. Trotzdem kann somit bei einer langen *B. burgdorferi* s.l.-Bande zusätzlich zur spezifischen, kürzeren Bande eine Doppelinfektionen mit Beteiligung von *B. garinii* nicht sicher bewiesen oder ausgeschlossen werden. In einem solchen Fall muss die *ospA*-PCR mit Restriktionsenzymverdau angeschlossen werden, um eine Doppelinfektion nachzuweisen.

Somit scheint die Multiplex-PCR eine geeignete Methode für den Routineeinsatz in weniger spezialisierten Labors zu sein, die eine schnelle und einfache Differenzierung der in Europa relevanten *Borrelia*-Spezies [200] erlaubt. Nachteile sind die unsichere Differenzierung von Mischinfektionen und von seltenen *B. burgdorferi* s.l. Spezies. Für solche Fälle muss zusätzlich auf eine Typisierung mittels RFLP zurückgegriffen werden.

IV.4. LightCycler

Ziel war die Entwicklung eines LightCycler-Protokolls für den sensitiven Nachweis und die Differenzierung von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Weiter sollten die *OspA*-Typen der Spezies *B. garinii* differenziert werden. Target der entwickelten LightCycler-PCR war das *ospA*-Gen. Es ist homogen innerhalb der Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*, jedoch innerhalb *B. garinii* entsprechend den *OspA*-Typen dieser Spezies deutlich heterogener [204]. Damit war es geeignet für die gewünschte Differenzierung mittels Hyb-Probes.

Die LightCycler-PCR wurde sowohl im SYBR Green- als auch im Hyb-Probes-Format durchgeführt. In beiden Formaten wurde aufgrund der Steigerung von Sensitivität und Spezifität der Detektion das Konzept der nested-PCR, mit Prä-PCR im Block-Cycler gewählt. Für beide Formate ließ sich eine hohe Sensitivität der PCR für den Nachweis der in Europa relevanten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* [200] demonstrieren. Aufgrund der höheren Sequenzabhängigkeit der Detektion wurde die Sensitivität im Hyb-Probes-Format zusätzlich für alle *OspA*-Typen von *B. garinii* getrennt evaluiert. Für alle getesteten Typen lag die ermittelte Sensitivität mit eins bis fünf detekierbaren *Borrelia* im selben Rahmen wie die der *ospA*-PCR auf dem Block-Cycler. Dabei konnte in beiden Formaten eine Spezifität der Reaktion für *B. burgdorferi* s.l. gesichert werden.

Im SYBR Green-Format entsteht das Fluoreszenzsignal durch unspezifisch interkallierende Dyes. Eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der Amplifikation ermöglicht es, das entstandenen Produkt anhand dessen Länge und GC-Gehalt zu spezifizieren [158]. Pietila et al. entwickelten für das Zielgen *recA* ein LightCycler-Protokoll zum Nachweis von *B.*

burgdorferi s.l. im SYBR Green-Format. Die Schmelzkurvenanalyse ermöglichte eine Abgrenzung von *B. garinii* gegenüber den beiden Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*, welche einen nahezu identischen Schmelzpunkt besitzten [138]. Das vorliegende Protokoll ermöglichte im SYBR Green-Format die sensitive Detektion von *B. burgdorferi* s.l.. Eine Differenzierung der Spezies war wegen zu geringer Unterschiede der Schmelzpunkte in diesem Format unmöglich. Aufgrund der sehr schnellen und einfachen Durchführbarkeit, der niedrigen Kosten und der hohen Sensitivität eignet sich der Nachweis im SYBR Green-Format als Screening PCR. Positive Proben müssten allerdings durch ein Anschlussverfahren (z.B. Hyb-Probes LightCycler-PCR) differenziert werden, da alle PCR-Verfahren zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. zumindest eine Differenzierung der drei gesichert humanpathogenen *Borrelia*-Spezies erlauben sollten [157].

Im Hyb-Probes-Format läßt sich mit hybridisierenden DNA-Sonden eine höhere Spezifität der Detektion und eine bessere Differenzierung des Amplifikationsprodukts erreichen. In der Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR können sogar einzelne Basenmutationen erkannt und von anderen unterschieden werden [26;27;94]. Rauter et al. entwickelten ein LightCycler-Protokoll mit Hyb-Probes für einen konservierten Abschnitt des *ospA*-Gens, was eine Differenzierung von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* erlaubte. Allerdings war die Spezies *B. valaisiana* nicht von *B. afzelii* unterscheidbar [151]. Ausserdem wurde die Sensitivität der Methode mit nur zwei *B. garinii* Stämmen evaluiert. Dies ist in Hinblick auf die Heterogenität dieser Spezies im *ospA*-Gen ungenügend. Für das vorliegende Protokoll wurde ein heterogener Abschnitt des *ospA*-Gens zur Hybridisierung mit den Hyb-Probes ausgewählt. Die Analyse mit 51 *ospA*-Sequenzen ergab charakteristische Fehlpaarungen mit *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Für *B. garinii* zeigte sich ein heterogeneres Mismatch-Muster, es ließen sich entsprechend den OspA-Typen dieser Spezies fünf Gruppen bilden. Beim Evaluieren der Typisierbarkeit von *B. burgdorferi* s.l. anhand von 110 PCR Reaktionen mit Isolaten aus klinischem Material ergaben sich charakteristische Schmelzpunkte jeweils für *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* und für alle fünf OspA-Typen von *B. garinii*. Die Unterschiede zwischen den Schmelzpunkten der einzelnen Gruppen waren alle signifikant. Bei der Speziesdifferenzierung wurde damit, basierend auf den getesteten Isolaten, eine richtige Zuordnung in 98 % der Fälle erreicht. Fehlzuordnungen traten allerdings bei der Differenzierung von *B. burgdorferi* s.s. und *B. valaisiana* auf. Die klinische Relevanz von *B. valaisiana* wird zur Zeit noch diskutiert. Zwar konnte diese Spezies aus Zecken von zahlreichen europäischen Staaten isoliert bzw. detektiert werden [42;75;91;92;129;141;155;156;166;199], die Prävalenz scheint in Süddeutschland

jedoch sowohl in Zecken als auch in Patienten gering zu sein. In der vorliegenden Arbeit war in einer der 72 positiven Zecken und in keiner der insgesamt 60 Patientenisolate oder 20 Patientenmaterialien eine *B. valaisiana* mittels RFLP detektierbar. Niedrige Prävalenzraten wurden auch in anderen süddeutschen Regionen gefunden [151]. Ein pathogenes Potential kann für *B. valaisiana* bisher nur vermutet werden, da der Nachweis in Patientenmaterial per PCR, nicht aber die Erregeranzucht gelungen ist [157]. Um Fehlzusordnungen bei dieser Spezies mit dem vorliegenden Hyb-Probes Protokoll zu vermeiden, empfiehlt sich bei der Differenzierung von Borrelien aus Material, das eine höhere Prävalenz von *B. valaisiana* vermuten lässt, eine zusätzliche Sicherung der Speziesdiagnose: Ein Restriktionsenzymverdau des LightCycler Amplifikats mit dem Enzym *HindIII* als sichere Abgrenzung zu *B. burgdorferi* s.s..

Signifikante Unterschiede der Schmelztemperaturen der OspA-Typen ermöglichten eine weitere Differenzierung innerhalb der Spezies *B. garinii*. Die Zuordnung stimmte in 87 % der Fälle mit der DNA Sequenzierung als Kontrolle überein. Fehlzusordnungen betrafen vor allem die Differenzierung von OspA-Typ 4 und 5. Durch Mitführen von Standardstämmen als T_m -Kallibratoren konnte die Sensitivität und Spezifität der Zuordnung zu diesen Typen deutlich erhöht, und damit die Rate der richtigen Zuordnung des OspA-Typs auf 93 % gesteigert werden. Eine weitere Absicherung des Ergebnisses lässt sich für die kritischen Typen durch Restriktionsverdau des LightCycler-Amplifikats mit dem Enzym *Kpn21* erreichen.

Vorteil der LightCycler-PCR ist dabei die kurze Reaktionsdauer, welche durch Verkürzung der einzelnen Reaktionsphasen und die schnellen Temperaturänderungen des Reaktionsgemisches erreicht wird [229]. Durch die simultane Amplifikation, Detektion und Differenzierung ist sie wesentlich weniger arbeitsintensiv als andere Methoden [151]. Das vorliegende LightCycler-Protokoll konnte in 1,5 Stunden durchgeführt werden und dauerte selbst mit Prä-PCR im Block-Cycler unter fünf Stunden. Für eine Typisierung mittels RFLP benötigt man inklusive Inkubationszeiten hingegen mindestens zwei Arbeitstage.

Durch das Monitoring des Fluoreszenzanstiegs nach jedem Amplifikationszyklus kann mit dem LightCycler die ursprünglich eingesetzte DNA-Menge quantifiziert werden [227;228]. Eine einfache Möglichkeit ist dabei das Erstellen einer Standardkurve und der Vergleich mit der untersuchten Probe. Aufgrund von Variationen der Amplifikationseffizienz kann sich bei diesem Vorgehen die reelle DNA-Konzentration von der ermittelten um ein Mehrfaches unterscheiden [150]. Durch das Mitführen eines Standards bei jedem PCR-Lauf lässt sich eine solche Fehleinschätzung jedoch verringern. Ein weiteres Problem bei der externen Quantifizierung sind PCR-Inhibitoren, die in unterschiedlichen Materialien vorhanden sein

können und die PCR-Effizienz beeinflussen. Dies kann nur durch eine interne Amplifikationskontrolle erkannt und somit berücksichtigt werden. Generell sollte jede Quantifikation als relativ angesehen werden [150]. Im vorliegenden Protokoll wurde auf eine Quantifizierung der PCR Ergebnisse verzichtet, da sich durch den Einsatz als nested-PCR oben genannte verfälschende Faktoren potenzieren. Damit erscheint der mögliche Fehler zu groß. Weiter würde die ausgeprägte Heterogenität des *ospA*-Gens eine Standardisierung für jeden einzelnen Typ notwendig machen, da geringe Unterschiede in der Amplifikationseffizienz nicht auszuschließen sind. Solche geringen Differenzen können schon zu einer vielfachen Verschätzung bei der Quantifizierung führen [150]. Eine Untersuchung verschiedener Materialien wie Kultur, Patientenmaterialien und Zecken mit möglicherweise enthaltenen PCR-Inhibitoren verkompliziert eine mögliche Standardisierung weiter. Deshalb wurde bei der Entwicklung des Vorliegenden LightCycler-Protokolls vorrangig Wert auf eine sensitive und spezifische Detektion mit zuverlässiger Differenzierung gelegt, eine Quantifizierung wurde nicht durchgeführt.

Die vorgestellte Methode stellt somit das erste LightCycler-Protokoll dar, das anhand aller *OspA*-Typen evaluiert wurde und neben der Differenzierung der in Europa relevanten *Borrelia* Spezies mit Einschränkungen eine Differenzierung der *OspA*-Typen von *B. garinii* erlaubt.

IV.5. Untersuchung der Zecken

IV.5.1. Prävalenz

Die Prävalenz von pathogenen *Borrelia*-Spezies in Zecken ist ein wichtiger Faktor, um das Risiko nach einem Zeckenstich abzuschätzen. In vielen europäischen Ländern wurden deshalb Prävalenzstudien durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsmethoden ist ein Vergleich der Daten aber oft schwierig. Hubalek et al. fand in einer Zusammenfassung europäischer Studien mit insgesamt 96169 untersuchten Zecken je nach Untersuchungsgebiet, Detektionsmethode und Zeckenstadium eine breite Variation von Prävalenzangaben mit Werten zwischen 0 und 58 %. Die durchschnittlichen Infektionsraten lagen bei 1,9 % für Larven, 10,8 % für Nymphen und 17,4 % für adulte Zecken. Die PCR war, im Vergleich zu Kultivierung und Mikroskopie, die insgesamt sensitivste Methode zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. in Zecken [80]. In der vorliegenden Arbeit wurden in einer explorativen Studie 529 *I. ricinus* Zecken untersucht und die gefundenen Borrelien differenziert. Die erhaltenen Prävalenzdaten liegen mit 4,7 % für Larven, 10,8 % für Nymphen und 21,7 % für adulte Zecken nahe bei den oben genannten Werten. Damit entsprechen sie auch den

Durchseuchungsraten, die bisherige Studien in Süddeutschland ermittelten [51;222]. Im Vergleich zu den anderen Gebieten wie Bad Tölz war vor allem die hohe Prävalenz im Englischen Garten, Gebiet EG1-2000, auffallend (42 % bei den Adulten). Ähnlich hohe Durchseuchungsraten wurden schon in vorherigen Studien für den Englischen Garten [56], die Isarregion im Norden Münchens [222], aber auch für andere Gebiete in Süddeutschland ermittelt [151] - wobei bei Prävalenzvergleichen immer unterschiedliche Anteile der untersuchten Zeckenstadien zu beachten sind. Da der Englische Garten ein häufig frequentiertes Freizeit- und Erholungsgebiet in München ist, scheint die hohe Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. von besonderer Bedeutung. Interessanterweise ergab eine Studie von Reimer et al. [151] zur Seroprävalenz von Anti-*B. burgdorferi* s.l. Antikörper mit niedrigeren Prävalenzraten in der Bevölkerung von München im Vergleich zu Bad Tölz umgekehrte Antikörper-Prävalenzdaten. Eine mögliche Erklärung ist die höhere berufliche Exposition der Bevölkerung in Bad Tölz (Bauern, Forstarbeiter). Die hohe Mobilität der Menschen in der Freizeit, Unterschiede im Freizeitverhalten von Stadt- und Landbevölkerung sowie eine möglicherweise nicht repräsentative Auswahl von Untersuchungsgebieten sind zusätzliche wichtige Faktoren.

Wie in den meisten Studien stieg die Durchseuchungsrate der Zecken von Larven über Nymphen zu adulten Zecken an. Das war zu erwarten, da eine transovariable Übertragung der Borrelien nur selten stattfindet und die Zecken diese erst durch die Blutmahlzeiten im Laufe ihrer Entwicklung erwerben [35].

IV.5.2. Spezies- und OspA-Typenverteilung

Neben Prävalenzdaten sind auch Untersuchungen zur Heterogenität von Borrelien in Zecken von großer epidemiologischer Bedeutung, unter anderem bei der Entwicklung eines europäischen Impfstoffes gegen *B. burgdorferi* s.l. [209]. Weiter können aus Vergleichen der Spezies- und OspA-Typen-Verteilung in Zecken mit derjenigen in Patienten möglicherweise wichtige pathogenetische Zusammenhänge abgeleitet werden [192;209]. Valide Daten zur Verteilung von Spezies und OspA-Typen in europäischen Zecken stellen dafür eine essentielle Datengrundlage dar.

Die am häufigsten in europäischen Zecken gefundene *Borrelia*-Spezies ist *B. garinii*, gefolgt von *B. afzelii*. Beide kommen, soweit untersucht, auf dem ganzen Kontinent vor. *B. burgdorferi* s.s. hingegen scheint hauptsächlich in Westeuropa prävalent zu sein und wird kaum in osteuropäischen Ländern detektiert [79]. *B. valaisiana* wurde, insgesamt wesentlich seltener, bisher in Zecken aus England, Irland, der Schweiz, Deutschland, Kroatien,

Tschechien und den Niederlanden gefunden [42;91;92;129;141;155;156;166;199]. *B. lusitaniae* wurde bisher lediglich in Portugal [140], der Ukraine, Tschechien und Moldavien nachgewiesen [141]. Einzelne Patientenisolat der Spezies *B. bissetii* konnten bisher in Slovenien charakterisiert werden [136]. Gerade die Unterschiede der Borrelienpopulationen in verschiedenen geographischen Regionen verdeutlichen die Wichtigkeit von breitgefächerten Zeckenuntersuchungen über den ganzen Kontinent. Nur so erhält man ein reales Bild von der Verteilung der *Borrelia*-Spezies.

Übereinstimmend mit den obigen Angaben war auch in der vorliegenden Arbeit *B. garinii* die am häufigsten gefundene Spezies, gefolgt von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s.. In einer Zecke wurde eine *B. valaisiana* detektiert. Vor allem für die Prävalenz von *B. afzelii* und *B. garinii* ergaben die durchgeführten Untersuchungen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sammelgebieten. Eine mögliche Erklärung dafür sind unterschiedliche Populationen von Wirtstieren. Die Durchseuchung der Zecken mit verschiedenen *Borrelia*-Spezies wird durch Zirkulieren in möglicherweise Spezies-spezifisch unterschiedlichen Transmissionszyklen aufrechterhalten (Zecke – Maus bzw. Zecke – Vogel) [117]. Während bei *B. afzelii* wahrscheinlich *Apodemus*-Mäuse als Resvoirtiere die größte Rolle spielen [63;81], wird für *B. garinii* hauptsächlich ein Zecken – Vogel Transmissionszyklus diskutiert [117;122;123]. Eine interessante Ausnahme stellt dabei der *B. garinii* OspA-Typ 4 dar, für den wiederum *Apodemus*-Mäuse als Reservoiertiere vermutet werden [78]. So können sich unterschiedliche Wirtspopulationen auf die Verteilung der *Borrelia*-Spezies in Zecken auswirken. Um einen solchen Zusammenhang für die untersuchten Gebiete nachzuweisen, wären jedoch Untersuchungen an einer größeren Zeckenzahl und gleichzeitig zusätzliche Studien zur Verteilung von Reservoiertieren notwendig.

Eine der detektierten Borrelien wurde nach der OspA-Sequenz dem Typ *Borrelia* A14S, einem genotypisch und phänotypisch neuen Isolat, welches höchstwahrscheinlich eine neue Genospezies darstellt zugeordnet [154;197]. Borrelien mit Ähnlichkeit zu diesem Isolat sind schon zuvor in Zecken [151;154] und in einem Patienten mit ACA [205] aus Süddeutschland detektiert worden. Weitere Studien, die diesen Subtyp methodisch erfassen und differenzieren können sind erforderlich, um seine Verbreitung zu evaluieren.

Wie bereits dargestellt, ist in Europa neben der Heterogenität der Spezies auch die Differenzierung von *B. garinii* in die OspA-Typen dieser Spezies [215] von großer Bedeutung. Leider existieren aber bisher nur wenige Daten zur Prävalenz der OspA-Typen in Zecken und Patientenmaterial aus begrenzter geographischer Herkunft. Untersuchungen von Wilske et al. zur Differenzierung der OspA-Typen in 90 Zeckenisolaten aus verschiedenen

Regionen Europas ergaben ein heterogenes Verteilungsbild. Der Vergleich zu Patientenmaterialien lässt dabei möglicherweise auf Unterschiede im pathogenen Potenzial der einzelnen Subtypen schließen [208]. Unter den Zeckenisolaten wurde OspA-Typ 6 mit über der Hälfte der Isolate am häufigsten gefunden, die anderen OspA-Typen von *B. garinii* (OspA-Typen 3 - 7) waren deutlich seltener. OspA-Typ 4, der relativ häufig aus dem Liquor von Patienten mit Neuroborreliose isoliert wird [208], konnte in keinem der 90 Zeckenisolate detektiert werden [209]. Der Nachweis dieses Typs in einer Zecke ist mittlerweile in einem Fall durch Anzucht gelungen [78]. Dagegen scheint der Nachweis mittels PCR etwas sensitiver zu sein [46]. Eine Erklärung für die Schwierigkeiten bei der Isolierung ist, dass dieser OspA-Typ bei der Kultivierung aus Mischinfektionen in der Zecke möglicherweise von anderen Typen überwachsen wird [208].

In Übereinstimmung mit obigen Ergebnissen war in der vorliegenden Studie OspA-Typ 6 der am häufigsten gefundene OspA-Typ, die Typen 3, 4 und 5 waren seltener. OspA-Typ 7 wurde nicht detektiert. Interessanterweise ergab sich für den OspA-Typ 4 mit 22 % eine relativ hohe Prävalenz, wobei das Vorkommen beinahe ausschließlich auf ein Sammelgebiet begrenzt war. Neben methodischen und pathogenetischen Aspekten [208] könnte diese ausgeprägte Fokalität des Auftretens möglicherweise einen weiteren Grund für die beschriebenen Schwierigkeiten bei der Kultivierung dieses OspA-Typs aus Zecken darstellen.

Bei einem Vergleich der Verteilung der OspA-Typen ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gebieten und Sammelzeitpunkten was auf eine ausgeprägte lokale Heterogenität der Borrelienpopulationen hinweist. Da diese Unterschiede aber über die Zeit nicht konstant waren, lassen sich keine Vorhersagen über die lokale Verteilung der OspA-Typen, und damit spezielle Risikogebiete, machen. Außerdem ist bei der Beurteilung der Unterschiede zu beachten, dass durch eine Unterteilung der Zecken nach Sammelort und Zeitpunkt die Zahl der gefundenen und differenzierten Borrelien in den einzelnen Kategorien sehr niedrig ist. Weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Zecken in den einzelnen Gebieten sind nötig, um zuverlässige Angaben über die Mikroheterogenität und deren Veränderung über die Zeit zu machen.

IV.6. Untersuchung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato aus klinischem Material

Die Heterogenität der Borrelien in klinischem Material hat neben epidemiologischen vor allem aus pathogenetischen Gesichtspunkten große Bedeutung. Möglicherweise sind einzelne *Borrelia*-Spezies bzw. OspA-Typen mit den verschiedenen Manifestationsformen der Lyme-

Borreliose assoziiert. Untersuchungen ergaben Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Typen in Haut bzw. Liquor von Patienten im Vergleich zur Verteilung im Vektor Zecke. Solche Unterschiede lassen auf einen möglichen Organotropismus bzw. unterschiedliche pathogene Potentiale der einzelnen Typen schließen. [192;215]. Die Mechanismen, die zu solchen Assoziationen führen, sind noch unklar. Diskutiert wird unter anderem eine unterschiedliche Serumresistenz [31;193] der verschiedenen Spezies und OspA-Typen.

Eine Infektion mit *B. afzelii* scheint eng mit der Entwicklung von kutanen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose verbunden zu sein [192;209]. So fand Wilske et al. in einer Untersuchung von 68 Hautisolaten in über 80 % der Fälle *B. afzelii*. Dagegen waren *B. garinii* und *B. burgdorferi* s.s. mit 11 % bzw. 6 % deutlich seltener [209]. In der vorliegenden Untersuchung konnte bei *Borrelia*-Isolaten aus der Haut von Patienten mit Erythema migrans mit 78 % eine vergleichbare Dominanz von *B. afzelii* aufgezeigt werden. Auch bei den direkt aus der Haut von Patienten nachgewiesenen Borrelien war *B. afzelii* mit 54% die am häufigsten gefundene Spezies. Beides steht im Kontrast zur mit 25 % deutlich niedrigeren Rate von *B. afzelii* bei den untersuchten Zecken.

Besonders eng scheint eine Assoziation von *B. afzelii* mit der ACA zu sein, eine These, die auch durch serologische Befunde gestützt wird [219]. Während manche Studien Hinweise auf einen exklusiven pathogenetischen Zusammenhang der ACA mit *B. afzelii* geben [12;13], wurden in anderen neben dieser dominanten Spezies auch *B. garinii* und *B. burgdorferi* s.s. detektiert [137;215]. Bei den vorliegenden Untersuchungen war die Zahl der Proben von Patienten mit ACA zu gering, um Aussagen über Assoziationen zu treffen. Allerdings spricht der Nachweis von *B. burgdorferi* s.s. in einer der Hautproben gegen einen exklusiven pathogenetischen Zusammenhang.

Weiterhin wird eine Assoziation zwischen der Infektion mit *B. garinii* und der Entwicklung einer Neuroborreliose diskutiert. So fand sich in den meisten europäischen Studien zur Typisierung von Liquorisolaten *B. garinii* als häufigste Genospezies [13;37;99;192]. Auch serologische Hinweise auf eine Dominanz dieser Spezies lassen sich finden [130]. Bei einer Untersuchung von 43 Liquorisolaten fand Wilske et al. mit 68 % der Isolate ebenfalls in über der Hälfte der Fälle *B. garinii*. Allerdings konnte bei vergleichenden Untersuchungen an Zeckenisolaten gezeigt werden, dass hier ein ähnlich hoher Prozentsatz dieser Spezies präsent ist [209]. Auch in zahlreichen anderen europäischen Zeckenstudien war *B. garinii* die am häufigsten gefundene Spezies [79]. Somit ist fraglich, ob es sich bei der Dominanz von *B. garinii* unter den Liquorisolaten um eine wirkliche pathogenetische Assoziation handelt, oder ob sich hier lediglich die Prävalenz der verschiedenen Spezies im Vektor *I. ricinus*

wiederspiegelt [211]. Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten 30 neu typisierte und 10 bereits in früheren Studien am Max v. Pettenkofer Institut differenzierte Liquorisolat [208] einer *Borrelia* Spezies bzw. einem OspA-Typ zugeordnet werden. Damit können, auch um mögliche Selektionsfehler zu vermeiden, in der Zusammenschau nun 66 im Zeitraum von 1984 bis 2002 am Max v. Pettenkofer Institut typisierte Liquorisolat betrachtet werden (siehe Anhang 7). Bei der Speziesdifferenzierung findet sich dabei in Übereinstimmung mit den meisten europäischen Studien [13;37;99;192] mit 48 % eine deutliche Dominanz der Spezies *B. garinii* gegenüber *B. burgdorferi* s.s. (24 %) und *B. afzelii* (23 %).

Interessanterweise konnte ein Liquorisolat durch DNA-Sequenzierung als *B. bissetii* identifiziert werden. *B. bissetii* ist hauptsächlich in Nordamerika prävalent [142;173]. Sie wurde dort jedoch bisher nicht als humanpathogen angesehen da sie bis dato nicht von Patienten isoliert werden konnten. Dagegen konnten in Europa 9 Stämme dieser Spezies von Patienten aus Slovenien isoliert werden [135]. Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Isolat von *B. bissetii* stellt somit die erste Beschreibung dieser Spezies in Deutschland dar. Die Isolierung aus dem Liquor eines Patienten mit Neuroborreliose stellt zusammen mit den Isolaten aus Slovenien die bisher angenommene Apathogenität dieser Spezies in Frage.

Interessante Unterschiede ergab eine Untersuchung von Wilske et al. zum Vergleich der verschiedenen OspA-Typen von *B. garinii* in Liquor- und Zeckenisolaten. OspA-Typ 4 fand sich mit 28 % auffallend häufig unter 43 Liquorisolaten, während er aus keiner der 90 Zecken isoliert werden konnte [209]. Dabei war jedoch unklar, ob neben pathogenetischen Unterschieden auch methodische Aspekte bei dieser Ungleichverteilung eine Rolle spielen – wie zum Beispiel unterschiedliches Wachstumsverhalten in Kultur und Überwachsen einzelner OspA-Typen in Mischkulturen [208]. In der vorliegenden Studie ergab die Untersuchung der OspA-Typen Verteilung bei den Liquorisolaten ein heterogenes Bild, wobei bis auf Typ 7 alle OspA-Typen von *B. garinii* gefunden werden konnten. Betrachtet man alle 66 am Max v. Pettenkofer Institut differenzierten *B. garinii* Isolate (siehe Anhang 7) ist OspA-Typ 4 mit 38 % (12 % aller Liquorisolat) und OspA-Typ 6 mit 31 % (10 % aller Liquorisolat) am häufigsten vertreten. Interessant ist es dabei aber vor allem, das Alter der untersuchten Patienten zu betrachten. Wie von Wilske et al. gezeigt werden konnte besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen Patientenalter und Verteilung der OspA-Typen in Liquorisolaten. Während OspA-Typ 4 vor allem aus erwachsenen Patienten zu isolieren ist ähnelt die OspA-Typen Verteilung in pädiatrischen Patienten eher der in Zecken gefundenen Verteilung, mit einer Dominanz von OspA-Typ 6 [46;208]. Diese Assoziation konnte in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. So lag das Alter der Patienten bei denen ein

OspA-Typ 6 isoliert werden konnte mit durchschnittlich 21 Jahren deutlich unter dem der Patienten bei denen ein OspA-Typ 4 isoliert wurde (durchschnittlich 55 Jahre). Der Altersdurchschnitt aller Patienten lag bei 41 Jahren. Weitere Untersuchungen sind notwendig um den pathogenetischen Zusammenhang dieser Assoziation zu erörtern. Hauptproblem bei einer validen Interpretation der vorhandenen Daten zur Subdifferenzierung von *B. garinii* stellt die - auch in der Zusammenschau - relativ geringe Anzahl von untersuchten Proben im Vergleich zur ausgeprägten Heterogenität dar. Auch in der Literatur finden sich nur wenige Studien über die OspA-Typen Verteilung bei Liquorisolaten [46;208;209;214]. Dies könnte einerseits an der schwierigen Detektion bzw. Isolierung der Borrelien in Liquor liegen und andererseits an den aufwändigen Typisierungsmethoden. Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Fällen aus verschiedenen geographischen Regionen sind nötig, um zuverlässige Daten über die Verteilung der OspA-Typen in klinischem Material zu erhalten. Dabei ist auch das Alter der Untersuchten Patienten als mögliche Einflussgröße zu beachten.

Ein weiteres Problem beim Vergleich von Studien stellen Unterschiede in den angewandten Detektions- und Differenzierungsmethoden dar. In einer Studie von Liveris et al wurden Borrelien aus Hautproben von Patienten kultiviert und parallel aus denselben Hautproben direkt mittels PCR amplifiziert. Die anschließende RFLP-Typisierung ergab ein deutlich unterschiedliches Verteilungsmuster der Subtypen in beiden Gruppen und wesentlich mehr Mischinfektionen in der Gruppe der direkt amplifizierten Borrelien [102]. Auch für *B. garinii* OspA-Typ 4 wird diskutiert, ob bei der Detektion - zumindest in Zecken - PCR und kultureller Nachweis unterschiedliche Ergebnisse erbringen [208]. Diese These kann dadurch gestützt werden, dass in der vorliegenden Untersuchung unter den direkt untersuchten Hautpräparaten signifikant mehr OspA-Typ 4 gefunden wurde als unter den kultivierten Hautisolaten. Um allerdings eine solche Beobachtung zu stützen wären Studien mit einer größeren Probenanzahl und vor allem mit direktem Vergleich der Typisierungsmethoden notwendig. Zudem ist die Bewertung solcher Unterschiede von Nachweisverfahren schwierig, da theoretisch jede Methode selektionieren kann: Die PCR z. B. durch ungleiche Amplifikation, und die Kultivierung durch Unterschiede in Wachstumsverhalten oder Antibiotikaresistenzen. Ein Vorteil der Kultivierung ist, dass mit dieser Methode nur lebende Borrelien nachgewiesen werden, während bei der PCR auch tote Organismen oder restliche Plasmid-DNA detektiert wird [171].

IV.7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden ermöglichten den Nachweis und die Differenzierung von *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen sowohl aus Zecken als auch aus unterschiedlichen Patientenkollektiven und damit die Diskussion wichtiger epidemiologischer und pathogenetischer Fragestellungen. So ließ sich bei der Untersuchung von Borrelien aus Zecken in den einzelnen Sammelgebieten eine ausgeprägte Mikroheterogenität feststellen. Im weiteren zeigte sich eine Inkonstanz der Verteilungsmuster über die Zeit. Damit ließen sich, auch aufgrund der zu geringen Probenanzahl, keine lokalen Vorhersagen über OspA-Typen-Verteilungen machen. Durch Untersuchungen von Hautisolaten ließ sich eine Assoziation von *B. afzelii* mit Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose [192;215] bestätigen. Die Anzahl der am Max v. Pettenkofer Institut differenzierten Liquorisolatate konnte durch die durchgeführten Untersuchungen deutlich erhöht werden. Nach Zusammenfassung des Datenmaterials zeigte sich wie in vorangegangenen Studien ein möglicher Zusammenhang zwischen *B. garinii* und der Neuroborreliose [192;200]. Bei einer Subdifferenzierung von *B. garinii* ergab sich ein heterogenes Bild mit interessanten Unterschieden wenn man das Alter der untersuchten Patienten berücksichtigt. So ließ sich eine bereits von Wilske et al. gefundene Häufung von OspA-Typ 6 bei pädiatrischen Patienten im Gegensatz zu OspA-Typ 4 bei erwachsenen Patienten bestätigen. Problematisch stellt sich nach wie vor die geringe Zahl der untersuchten Proben in den einzelnen Kategorien dar. Um die herausragende pathogenetische Bedeutung einzelner OspA-Typen, unterschiedliche Prävalenzen in Abhängigkeit vom Alter und methodische Einflüsse auf die Detektion, insbesondere von Typ 4 zu klären, sind weitere umfangreiche Studien an Zecken und klinischem Material nötig. Bei der Beurteilung obiger Aussagen ist weiterhin zu beachten, dass es sich bei der durchgeführten Untersuchung um eine explorative Studie handelt. Die getroffenen Aussagen sind damit vor allem als Hinweise auf interessante Frage- und Problemstellungen und Anstöße für zukünftige konfirmative Studien an größeren Kollektiven zu sehen [163].

Aus der insgesamt in den Zecken und dem klinischen Material gefundenen Heterogenität der Borrelien lassen sich trotzdem wichtige Schlussfolgerungen für die Diagnostik und die Entwicklung eines Impfstoffs ziehen [209]. Bei der Vakzine-Entwicklung gilt OspA als einer der aussichtsreichsten Kandidaten [208]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass OspA-Antikörper gegen einzelne Borrelienspezies bzw. OspA-Typen aufgrund immunologischer Unterschiede oft nicht protektiv gegen andere sind [50;103;104;169]. Im Gegensatz zu den USA, wo für einen monovalenten OspA-Impfstoff gegen *B. burgdorferi* s.s. eine hohe Effizienz nachgewiesen werden konnte [187], muss man bei der europäischen

Impfstoffentwicklung alle prävalenten und pathogenen *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen beachten [215]. Zuverlässige Daten zur Verteilung der verschiedenen *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen in Vektor, Reserviertieren und klinischem Material stellen somit eine essentielle epidemiologische Basis für derlei Entwicklungen dar [200]. Unterschiede der Borrelienpopulationen auch innerhalb Europas unterstreichen die Notwendigkeit, diese Daten in breitgefächerten Untersuchungen auf dem ganzen Kontinent zu erheben. Die vorliegende Studie bestätigt anhand der entwickelten Differenzierungsmethoden auch für den südbayerischen Raum eine ausgeprägte Heterogenität der Borrelien. Besonders interessant war, dass bei den Untersuchungen an Zecken- und Patientenmaterial neben den häufigen in Europa detektierten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* auch zwei seltenere Genospezies detektiert wurden: *B. bissettii* und *Borrelia* A14S. Vor allem bei der erst 1999 entdeckten ‚Spezies‘ *Borrelia* A14S ist bisher nur wenig über die Verteilung und Häufigkeit in Europa bekannt [197]. Da dieser Borrelien-Typ aber neben dieser Studie auch in Zecken [151;154] und Patientenmaterial [55;205] aus Deutschland und Frankreich detektiert wurde, scheint eine weite Verbreitung dieses vermutlich humanpathogenen Typs [197] möglich. Die Kultivierung einer *B. bissettii* aus dem Liquor eines Patienten stellt die erste Beschreibung dieser Spezies in Deutschland dar und gibt Anlass zur Diskussion einer Humanpathogenität dieser Spezies. Über die tatsächliche Verbreitungsgebiete dieser Spezies und damit ihrer Relevanz für eine Impfstoffentwicklung müssen weitere Untersuchungen an größeren Kollektiven in ganz Europa Aufschluss geben.

Trotz der bekannten Relevanz der Heterogenität von Borrelien selbst auf der Ebene der OspA-Typen für die Impfstoffentwicklung [209], existieren diesbezüglich bisher nur wenige epidemiologische Daten. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass alle OspA-Typen von *B. garinii* (3 bis 7) entweder in Patienten und in Zecken (4,5,6) oder zumindest in einem von beiden (3,7) nachweisbar waren, und somit bei einer Impfstoffentwicklung berücksichtigt werden müssen. Dies bestätigt Studien zur OspA-Typen-Verteilung in Patienten und Zecken von Wilske et al. [208;209;215]. Jedoch ist das bisherige Datenmaterial zu begrenzt, was Anzahl und geographische Herkunft angeht, um fundierte Aussagen über die Verteilung zu treffen. Europaweit durchgeführte Studien zur Differenzierung von Borrelien einschließlich einer OspA-Typisierung sind nötig, um ein vollständiges Bild über die Verteilung und Prävalenz der immunologisch relevanten Stämme zu erhalten. Dies ist eine wichtige Grundlage für die Entwicklung eines wirkungsvollen europäischen Impfstoffs.

Daneben hat die demonstrierte Heterogenität der Borrelien auch wichtige Implikationen für die Diagnostik der Lyme-Borreliose. Hauptstandbein der mikrobiologischen Diagnostik ist

die Serologie. Sowohl für die USA, als auch für Europa wird zur Verbesserung von Sensitivität und Spezifität eine Zwei-Stufen-Diagnostik mit einem Screening- (z.B. IgM- und IgG-ELISA) und einem Bestätigungsverfahren (z.B. IgM- und IgG-Immunoblot) empfohlen [1;82;205]. Dennoch sind Kreuzreaktionen, unspezifische Reaktionen und die niedrige Sensitivität in den Frühstadien der Erkrankung nach wie vor wichtige Problemfelder [211]. Eine große Zahl von Antigenen unterschiedlicher Stämme wurde bisher schon in serologischen Studien evaluiert. Dabei zeigte sich, dass das Muster der Reaktivität im Westernblot von Spezies, Serotyp und sogar Stamm, welcher als Antigenquelle verwendet wurde, abhängt [68;69;111]. Somit stellt die Heterogenität der Borrelien in Europa eine große Herausforderung für die Serologie dar [200]. Es erwies sich desweiteren, dass die regionale Verteilung der *Borrelia*-Spezies die Reaktivität der Patientenserum mit den Testantigenen von verschiedenen Stämmen beeinflussen kann [33;120]. Damit müssen Untersuchungen zur lokalen Verteilung der verschiedenen Spezies und Serotypen Grundlage für eine sinnvolle Auswahl von Stämmen und Antigenen für die serologische Diagnostik sein. Wie auch die durchgeführten Untersuchungen zeigen, muss häufig auch in eng begrenzten Regionen von einer großen Heterogenität der Stämme ausgegangen werden. Hier kann die Verwendung von rekombinanten Antigenen, mit Kombination von homologen Proteinen verschiedener Stämme, eine gute Lösung zur Verbesserung der serologischen Diagnostik darstellen [174;213].

Auch für die Etablierung und Evaluierung von epidemiologischen und diagnostischen PCR-Protokollen hat die demonstrierte Heterogenität der Borrelien wichtige Implikationen. Die PCR ist vor allem bei atypischen Krankheitsverläufen diagnostisch bedeutsam [171]. Generell sollte für eine diagnostische PCR sichergestellt sein, dass alle pathogenen *Borrelia*-Spezies gleichermaßen sensitiv erfasst werden [171], in Europa vor allem die gesichert humanpathogenen Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* [16] und die möglicherweise pathogene Spezies *B. valaisiana* [157]. Die Detektion eines *Borrelia* A14S-ähnlichen Isolats und einer *B. bissettii* in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass diese seltenen Spezies in Europa weiter verbreitet sein könnten, als bisher angenommen. Sie sollten somit bei der Entwicklung von PCR-Protokollen für epidemiologische und diagnostische Zwecke stärker berücksichtigt werden. Bei der Evaluierung der verschiedenen Primer ergaben sich für einzelnen OspA-Typen Unterschiede in der PCR-Sensitivität. Dies zeigt, dass bei der Etablierung eines PCR-Protokolls, je nach Zielgen auch auf der Ebene der OspA-Typen, alle entsprechenden Typen einzeln berücksichtigt werden müssen. Dies ist bei allen bislang veröffentlichten *ospA*-PCR Protokollen jedoch nicht der Fall [84;97;149;151;157].

Weitere umfangreiche Untersuchungen zur Verteilung von *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen in ganz Europa sind unerlässlich, um wichtige epidemiologische und pathogenetische Fragestellungen beantworten zu können. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Nachweis und Differenzierungsmöglichkeiten für *B. burgdorferi* s.l. stellen hierfür eine zuverlässige, schnelle und praktikable methodische Basis dar.

V. Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose, ausgelöst durch den Erreger *B. burgdorferi* s.l., ist die häufigste von Zecken übertragene Infektionserkrankung der nördlichen Hemisphäre. Der *B. burgdorferi* s.l. Komplex besteht mittlerweile aus mindestens elf definierten Spezies. In Europa ist für die drei Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* eine Humanpathogenität gesichert, für *B. valaisiana* wird sie zumindest vermutet. Anhand des Oberflächenproteins OspA wurden für Europa mindestens sieben verschiedene OspA-Typen definiert. Die Spezies *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* sind homogen in ihrem OspA-Typ und entsprechen Typ 1 und 2. Die Spezies *B. garinii* hingegen ist wesentlich heterogener und lässt sich in fünf OspA-Typen (3 bis 7) differenzieren. Die Heterogenität der Borrelien in Europa hat wichtige Implikationen für die Pathogenitätsforschung (u. a. Organotropismus), da verschiedene Spezies bzw. OspA-Typen möglicherweise mit unterschiedlichen klinischen Manifestationsformen der Lyme-Borreliose assoziiert sind. Außerdem beeinflusst die Heterogenität maßgeblich die Entwicklung von einem europäischen Impfstoff und von diagnostischen und epidemiologischen Testsystemen. Valide Daten zur Verteilung der Spezies und OspA-Typen sind somit Voraussetzung für derlei Entwicklungen. Jedoch ist das bisher vorhandene Datenmaterial, besonders in Bezug auf die Verteilung der OspA-Typen, sehr begrenzt, was möglicherweise auch an dem hohen Aufwand und den Kosten bisher beschriebener Differenzierungsmethoden liegt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einfache und zuverlässige OspA-PCR basierende Methoden entwickelt die einen sensitiven Nachweis und eine Differenzierung aller in Europa relevanten *B. burgdorferi* s.l. Spezies erlauben. Im Gegensatz zu vielen bisher veröffentlichten PCR Protokollen wurde die Sensitivität der Methoden mit einem umfangreichen Panel von 9 *B. burgdorferi* s.l. Stämmen der verschiedenen Subtypen evaluiert und die Spezifität durch Testung von 18 verwandten Spirochäten abgesichert. Nur so kann bei der Heterogenität der Borrelien die Sensitivität und Spezifität einer PCR ausreichend evaluiert werden.

Die hier entwickelte RFLP Analyse erlaubt eine Differenzierung aller in Europa relevanten Spezies und zusätzlich der fünf OspA-Typen von *B. garinii*. Sie stellt somit ein ideales Werkzeug für notwendige epidemiologische Untersuchungen zur Heterogenität von *B. burgdorferi* s.l. in Europa dar. Im Weiteren ist, im Gegensatz zu vielen etablierten Typisierungsmethoden, eine zuverlässige Differenzierung von Doppelinfektionen möglich, wie sie in Zecken und klinischem Material schon mehrfach beschrieben sind.

Die entwickelte Multiplex-PCR erlaubt eine schnelle und sehr einfache Differenzierung der klinisch relevanten Spezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* in

einem Reaktionsansatz. Sie stellt das erste beschriebene Multiplex-PCR-Protokoll zur Differenzierung von *B. burgdorferi* s.l dar.

Der LightCycler ist eine schnelle, moderne real-time-PCR Methode. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein LightCycler-Protokoll entwickelt, das eine Differenzierung der in Europa relevanten Spezies und mit Einschränkungen auch der verschiedenen OspA-Typen von *B. garinii* erlaubt.

In einer Pilotstudie wurde die Verteilung von *Borrelia*-Spezies und OspA-Typen in Zecken und in klinischem Material untersucht. Die Borrelienpopulationen aus den Zecken der verschiedenen Sammelgebiete zeigten eine ausgeprägte Mikro- und Makroheterogenität, wobei aufgrund der Inkonstanz der Verteilungsmuster über die Zeit keine lokalen Vorhersagen über das Vorkommen einzelner Subtypen gemacht werden konnten. Ein interessanter Befund war die hohe fokale Prävalenz von OspA-Typ 4 in einem Gebiet, da diesem OspA-Typ möglicherweise eine herausragende pathogenetische Bedeutung zukommt und er bisher nur selten in Zecken gefunden wurde.

Die Differenzierung von Borrelien aus klinischem Material erlaubt Rückschlüsse auf wichtige pathogenetische Zusammenhänge und Assoziationen. Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte eine Assoziation von *B. afzelii* mit kutanen Manifestationen der Lyme-Borreliose bestätigt werden. Bei der Differenzierung von Isolaten von Patienten mit Neuroborreliose zeigte sich wie schon in vorangegangenen Studien eine Dominanz der Spezies *B. garinii* und auf der Ebene der OspA-Typen Verteilung interessante Unterschiede in der in Bezug auf das Alter der untersuchten Patienten.

Insgesamt wurde in dem untersuchten Material neben *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana* und allen fünf OspA-Typen von *B. garinii* auch die Genospezies *Borrelia* A14S sowie *B. bissettii* detektiert. *Borrelia* A14S stellt eine erst kürzlich beschriebene neue Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. dar, deren Verteilung in Europa noch weitgehend unbekannt ist. Der Nachweis von *B. bissettii* aus einer Liquorprobe ist die erste Beschreibung dieser Spezies in Deutschland und wirft Fragen über ihre - bisher vermutete - Apathogenität auf. Die erhaltenen Prävalenzdaten der verschiedenen Borrelien stellen einen Schritt zur Erarbeitung einer epidemiologischen Basis für die Entwicklung eines zuverlässigen Impfstoffs und diagnostischer und epidemiologischer Testsysteme in Europa dar. Aufgrund der Unterschiede der Borrelienpopulationen in verschiedenen geographischen Regionen sind hierfür aber weitere breitgefächerte Untersuchungen auf dem ganzen Kontinent nötig. Die in dieser Arbeit entwickelten, breit evaluierten und einfachen durchzuführenden Methoden stellen für derlei Untersuchungen eine praktikable methodische Basis dar.

VI. Literaturliste

1. (1995) From the Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *JAMA* 274: 937
2. (1999) Availability of Lyme disease vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 48: 35-6, 43
3. Ackermann R, Gollmer E, Rehse-Küper B (1985) Progressive Borrelien-Encephalomyelitis. *Dtsch Med Wochenschr* 26: 1036-1042
4. Ackermann R, Kabatzki J, Boisten HP, Steere AC, Grodzicki RL, Hartung S, Runne U (1984) Spirochete etiology of erythema chronicum migrans disease. *Dtsch Med Wochenschr* 109: 92-97
5. Afzelius A (1910) Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 16. Dezember 1910. *Deramtol Syph (Berlin)* 101: 405-406
6. Allawi HT, SantaLucia J Jr (1997) Thermodynamics and NMR of Internal G:T Mismatches in DNA. *Biochemistry* 36: 10581-10594
7. Allawi HT, SantaLucia J Jr (1998) Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G:A mismatches in DNA. *Biochemistry* 37: 2170-2179
8. Allawi HT, SantaLucia J Jr (1998) Nearest neighbor thermodynamics of Internal A:C Mismatches in DNA: Sequence dependence and pH effects. *Biochemistry* 37: 9435-9444
9. Allawi HT, SantaLucia J Jr (1998) Thermodynamics of Internal C:T Mismatches in DNA. *Nucleic Acids Res* 26: 2694-2701
10. Asbrink E, Hovmark A, Hederstedt B (1984) The spirochetal etiology of acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. *Acta Derm Venereol* 64: 506-512
11. Asbrink E, Hovmark A, Weber K (1993) Acrodermatitis chronica atrophicans. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 193-204
12. Assous M.V., Postic D., Paul G., Nevot P., Baranton G. Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* Apr;12(4):261-8. 1993.
13. Balmelli T, Piffaretti JC (1995) Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol* 146: 329-340
14. Bannwarth A (1941) Chronische lymphocytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und 'Rheumatismus'. *Arch Psychiatr Nervenkr* 113: 284-376
15. Bannwarth A (1944) Zur Klinik und Pathogenese der 'chronischen lymphocytären Meningitis'. *Arch Psychiatr Nervenkr* 117: 161-185
16. Baranton G, Marti RN, Postic D (1998) Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 110: 850-855
17. Baranton G, Postic D, Saint G, I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42: 378-383
18. Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57: 521-525

19. Barbour AG (1988) Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* 26: 475-478
20. Barbour AG, Garon CF (1987) Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* 237: 409-411
21. Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400
22. Barbour AG, Schrupf ME (1986) Polymorphisms of major surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 263: 83-91
23. Belfaiza J, Postic D, Bellenger E, Baranton G, Girons IS (1993) Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 31: 2873-2877
24. Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, Habicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Edelman R, Kaslow RA (1983) Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med* 308: 740-742
25. Bergstrom S, Bundoc VG, Barbour AG (1989) Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 3: 479-486
26. Bernard PS, Ajioka RS, Kushner JP, Wittwer CT (1998) Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. *Am J Pathol* 153: 1055-1061
27. Bernard PS, Lay MJ, Wittwer CT (1998) Integrated amplification and detection of the C677T point mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves. *Anal Biochem* 255: 101-107
28. Bernard PS, Pritham GH, Wittwer CT (1999) Color multiplexing hybridization probes using the apolipoprotein E locus as a model system for genotyping. *Anal Biochem* 273: 221-228
29. BgVV, RKI (1996) Lyme-Borreliose, Erkennung und Verhütung, Merkblatt für Ärzte. Merkblatt für Ärzte Best.-Nr. 60056:
30. Bhattacharya B, Karak K, Ghosal AG, Roy A, Das S, Dandapat P, Khetawat D, Mondal DK, Bhattacharya S, Chakrabarti S (2003) Development of a new sensitive and efficient multiplex polymerase chain reaction (PCR) for identification and differentiation of different mycobacterial species. *Trop Med Int Health* 8: 150-157
31. Breitner-Ruddock S, Wurzner R, Schulze J, Brade V (1997) Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 185: 253-260
32. Buchwald A (1883) Ein Fall diffuser idiopathischer Haut-Atrophie. *Dermatol Vierteljahresschr* 10: 553-556
33. Bunikis J, Olsen B, Westman G, Bergstrom S (1995) Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. *J Clin Microbiol* 33: 1473-1478
34. Burgdorfer W (1984) Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57: 515-520
35. Burgdorfer W (1989) Vector/host relationships of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Rheum Dis Clin North Am* 15: 775-787
36. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319

37. Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V (1996) Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol* 34: 1072-1078
38. Busch U, Hizo-Teufel C, Bohmer R, Fingerle V, Rossler D, Wilske B, Preac-Mursic V (1996) *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from cutaneous Lyme borreliosis biopsies differentiated by pulsed-field gel electrophoresis. *Scand J Infect Dis* 28: 583-589
39. Caporale DA, Kocher TD (1994) Sequence variation in the outer-surface-protein genes of *Borrelia burgdorferi*. *Mol Biol Evol* 11: 51-64
40. Casjens S, DeLange M, Ley HL, III, Rosa P, Huang WM (1995) Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *J Bacteriol* 177: 2769-2780
41. Christen HJ, Hanefeld F, Eiffert H, Thomssen R (1993) Epidemiology and clinical manifestations of Lyme borreliosis in childhood. A prospective multicentre study with special regard to neuroborreliosis. *Acta Paediatr Suppl* 386: 1-75
42. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Poldini L, Frusteri L, van DP, I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema S, Maroli M (1998) 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* 17: 90-94
43. Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith D.C., Burton AH, Dicker RC, Sullivan K, Fagan RF, Arner TG. *Epi Info, version 6: a word-processing, database, and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers.* 1995. Atlanta, Ga, Center for Disease Control and Prevention.
44. Demaerschalck I, Ben Messaoud A, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E (1995) Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 33: 602-608
45. Duray PH, Steere AC (1986) The spectrum of organ and systems pathology in human Lyme disease. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 263: 169-178
46. Eiffert H, Ohlenbusch A, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Matuschka FR (1995) Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid. *J Infect Dis* 171: 476-479
47. el-Adhami W, Roberts L, Vickery A, Inglis B, Gibbs A, Stewart PR (1991) Epidemiological analysis of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak using restriction fragment length polymorphisms of genomic DNA. *J Gen Microbiology* 137: 2713-2720
48. Ferdows MS, Barbour AG (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5969-5973
49. Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA (1990) Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* 250: 553-556
50. Fikrig E, Barthold SW, Persing DH, Sun X, Kantor FS, Flavell RA (1992) *Borrelia burgdorferi* strain 25015: characterization of outer surface protein A and vaccination against infection. *J Immunol* 148: 2256-2260
51. Fingerle V, Bergmeister H, Liegl G, Vanek E, Wilske B (1994) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. *J Spiroch Tick Dis* 1: 41-45
52. Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B (1995) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol* 33: 1867-1869

53. Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B (2000) Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 189: 59-66
54. 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. 1996. VII International Congress on Lyme Borreliosis, San Francisco, California.
55. Fingerle V, Michel H, Schulte-Spechtel U, Göttner G, Hizo-Teufel C, Hofmann H, Weber K, Wilske B (2004) A14S - a new *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies as relevant cause of human disease. *Int J Med Microbiol Wissenschaftliches Programm 55 DGHM-Tagung 26 September - 29 September 2004 in Münster* : 207
56. Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B (1999) Coexistence of *ehrlichiae* of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 188: 145-149
57. Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B (2002) 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* 40: 1456-1463
58. 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, . (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586
59. Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M (1996) *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* 40: 877-881
60. Gambel JM, Brundage JF, Kuschner RA, Kelley PW (1998) Deployed US Army soldiers' knowledge and use of personal protection measures to prevent arthropod-related casualties. *J Travel Med* 5: 217-220
61. Garin C, Bujadoux CH (1922) Paralyse par les tiques. *J Med Lyon* 71: 756-767
62. Gern L, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Krampitz H E (1993) The ecology of Lyme borreliosis in Europe. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 59-69
63. Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA (1998) European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralbl Bakteriol* 287: 196-204
64. Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidemiol* 15: 665-669
65. Guo Z, Liu Q, Smith LM (1997) Enhanced discrimination of single nucleotide polymorphisms by artificial mismatch hybridization. *Nature Biotech* 4: 331-335
66. Haff LA (1994) Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods Appl* 3 (6): 332-337
67. Hansen K, Lebech AM (1991) Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin G, A, and M. *Ann Neurol* 30: 197-205
68. Hauser U, Krahl H, Peters H, Fingerle V, Wilske B (1998) Impact of strain heterogeneity on Lyme disease serology in Europe: comparison of enzyme-linked immunosorbent assays using different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Microbiol* 36: 427-436

69. Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B (1997) Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. J Clin Microbiol 35: 1433-1444
70. Hellerström S (1930) Erythema chronicum migrans Afzelii. Acta Derm Venerol 11: 315-321
71. Herxheimer K, Hartmann K (1902) Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 61: 57-76
72. Herzer P (1989) Klinik. In: Herzer P (ed) Lyme-Borreliose, Epidemiologie, Ätiologie, Diagnostik, Klinik und Therapie. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag, Darmstadt, pp 60-89
73. Herzer P (1993) Joint manifestations. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 168-184
74. Herzer P (1991) Joint manifestations of Lyme borreliosis in Europe. Scand J Infect Dis Suppl 77: 55-63
75. Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E (2002) 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 211: 225-230
76. Ho-Pun-Cheung T, Lamarque D, Josse R (1999) Protective effect of clothing impregnated with permethrin against *D. reticulatus* and *D. marginatus* in an open biotope of central western France. Bull Soc Pathol Exot 92: 337-340
77. Howe TR, LaQuier FW, Barbour AG (1986) Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. Infect Immun 54: 207-212
78. Hu CM, Wilske B, Fingerle V, Lobet Y, Gern L (2001) Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J Clin Microbiol 39: 1169-1171
79. Hubalek Z, Halouzka J (1997) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur J Epidemiol 13: 951-957
80. Hubalek Z, Halouzka J (1998) Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasitol Res 84: 167-172
81. Humair PF, Rais O, Gern L (1999) Transmission of *Borrelia afzelii* from Apodemus mice and Clethrionomys voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. Parasitology 118 (Pt 1): 33-42
82. Hunfeld K-P, Oschmann P, Kaiser R, Schulze J, Brade V (1998) Diagnostik: Lyme-Borreliose. Bremen: UNI-MED 81-108
83. Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA (1999) Incidence of Lyme borreliosis in the Wurzburg region of Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 18: 697-703
84. Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, Sibilias J, Piemont Y (2000) Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. J Clin Microbiol 38: 1895-1900
85. Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM (1984) Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med 57: 529-537
86. Johnson RC, Kodner C, Russell M (1986) Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 54: 897-898
87. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. Int J Syst Bacteriol 34: 438-497

88. Kahl O (1993) Die Zecke als Vektor. In: Süß J, Zenk T (eds) Durch Zecken übertragbare Erkrankungen. Immuno GmbH, Berlin, pp 3-18
89. Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R (1998) 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. Zentralbl Bakteriol 287: 41-52
90. Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiol Immunol 37: 843-848
91. Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS (1997) The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. Eur J Epidemiol 13: 67-72
92. Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE (1998) Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Appl Environ Microbiol 64: 1169-1174
93. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. Nature 339: 237-238
94. Lay MJ, Wittwer CT (1997) Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. Clin Chem 43: 2262-2267
95. Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol 47: 921-925
96. Lebech AM, Clemmensen O, Hansen K (1995) Comparison of in vitro culture, immunohistochemical staining, and PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in tissue from experimentally infected animals. J Clin Microbiol 33: 2328-2333
97. Lebech AM, Hansen K (1992) Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 30: 1646-1653
98. Lebech AM, Hansen K, Rutledge BJ, Kolbert CP, Rys PN, Persing DH (1998) Diagnostic Detection and Direct Genotyping of *Borrelia burgdorferi* Regular by Polymerase Chain Reaction in Cerebrospinal Fluid in Lyme Neuroborreliosis. Mol Diagn 3: 131-141
99. Lebech AM, Hansen K, Wilske B, Theisen M (1994) Taxonomic classification of 29 *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients with Lyme borreliosis: a comparison of five different phenotypic and genotypic typing schemes. Med Microbiol Immunol (Berl) 183: 325-341
100. Lipschütz B (1913) Über eine seltene Erythemform (Erythema chronicum migrans). Arch Dermatol Syph 118: 349-356
101. Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I (1995) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 33: 589-595
102. Liveris D, Varde S, Iyer R, Koenig S, Bittker S, Cooper D, McKenna D, Nowakowski J, Nadelman RB, Wormser GP, Schwartz I (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. J Clin Microbiol 37: 565-569
103. Lovrich SD, Callister SM, Lim LC, DuChateau BK, Schell RF (1994) Seroprotective groups of Lyme borreliosis spirochetes from North America and Europe. J Infect Dis 170: 115-121
104. Lovrich SD, Callister SM, Lim LC, Schell RF (1993) Seroprotective groups among isolates of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 61: 4367-4374
105. Maiwald M, Oehme R, March O, Petney TN, Kimmig P, Naser K, Zappe HA, Hassler D, von Knebel DM (1998) Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. Epidemiol Infect 121: 103-108

106. Marconi RT, Garon CF (1992) Development of polymerase chain reaction primer sets for diagnosis of Lyme disease and for species-specific identification of Lyme disease isolates by 16S rRNA signature nucleotide analysis. *J Clin Microbiol* 30: 2830-2834
107. Marconi RT, Liveris D, Schwartz I (1995) 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* 33: 2427-2434
108. Marconi RT, Lubke L, Hauglum W, Garon CF (1992) Species-specific identification of and distinction between *Borrelia burgdorferi* genomic groups by using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol* 30: 628-632
109. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M (2002) Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. : *J Clin Lab Anal* 16: 47-51
110. Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T (2001) *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1817-1824
111. Mathiesen MJ, Hansen K, Axelsen N, Halkier-Sorensen L, Theisen M (1996) Analysis of the human antibody response to outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 185: 121-129
112. Misonne MC, Hoet PP (1998) Species-specific plasmid sequences for PCR identification of the three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involved in Lyme disease. *J Clin Microbiol* 36: 269-272
113. Mommert S, Gutzmer R, Kapp A, Werfel T (2001) Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 39: 2663-2667
114. Mullis K, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RH, Horn GT, Ehrlich HA (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* 51: 275-284
115. Nadelman RB, Wormser GP (1998) Lyme borreliosis. *Lancet* 352: 557-565
116. Nakao M, Miyamoto K (1995) Mixed infection of different *Borrelia* species among Apodemus speciosus mice in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol* 33: 490-492
117. Nakao M, Miyamoto K, Fukunaga M (1994) Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. *J Infect Dis* 170: 878-882
118. Needham GR, Teel PD (1991) Oxford University Press. *Annu Rev Entomol* 36: 659-681
119. Newton CR, Graham A (1994) PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp 59
120. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G, Hogrefe WR (1996) Serodiagnosis of Lyme borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* western blots (immunoblots). *J Clin Microbiol* 34: 1732-1738
121. O'Connell S, Granstrom M, Gray JS, Stanek G (1998) Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriologie* 287: 229-240
122. Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S (1995) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* 61: 3082-3087
123. Olsen B, Jaenson TG, Noppa L, Bunikis J, Bergstrom S (1993) A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* 362: 340-342

124. Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, Schafer C, Wellensiek HJ, Pflughaupt KW (1998) Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol* 245: 262-272
125. Patsoula E, Spanakos G, Sofianatou D, Parara M, Vakalis NC (2003) A single-step, PCR-based method for the detection and differentiation of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. *Ann Trop Med Parasitol* 97: 15-21
126. Paul H, Gerth H-J, Ackermann R (1986) Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Hyg* 263: 473-476
127. Perez-Hernandez X, Mendez-Alvarez S, Claverie-Martin F (2002) A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42: 273-277
128. Persing DH, Rutledge BJ, Rys PN, Podzorski DS, Mitchell PD, Reed KD, Liu B, Fikrig E, Malawista SE (1994) Target imbalance: disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J Infect Dis* 169: 668-672
129. Peter O, Bretz AG, Bee D (1995) Occurrence of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ixodid ticks of Valais, Switzerland. *Eur J Epidemiol* 11: 463-467
130. Peter O, Bretz AG, Postic D, Dayer E (1997) Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* 3: 423-431
131. Peyret N, Seneviratne PA, Wittwer CT (1999) Nearest neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A:A, C:C, G:G, and T:T mismatches. *Biochemistry* 38: 3468-3477
132. Pfister HW, Kristoferitsch W, Meire C (1993) Early neurological involvement (Bannwarth's Syndrome). In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 152-167
133. Pfister HW, Wilske B, Weber K (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 343: 1013-1016
134. Pichon B, Godfroid E, Hoyois B, Bollen A, Rodhain F, Perez-Eid C (1995) Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species: possible implications for clinical manifestations. *Emerg Infect Dis* 1: 89-90
135. Picken RN, Cheng Y, Strle F, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljić E, Han D, Nelson JA, Picken MM, Trenholme GM (1996) Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Slovenia revealing significant differences between tick and human isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 313-323
136. Picken RN, Cheng Y, Strle F, Picken MM (1996) Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J Infect Dis* 174: 1112-1115
137. Picken RN, Strle F, Picken MM, Ruzic-Sabljić E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cimperman J (1998) Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* 110: 211-214
138. Pietila J, He Q, Oksi J, Viljanen MK (2000) 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* 38: 2756-2759
139. Postic D, Assous M, Belfaiza J, Baranton G (1996) Genetic diversity of *Borrelia* of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* 108: 748-751
140. Postic D, Assous MV, Grimont PA, Baranton G (1994) Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 44: 743-752

141. Postic D, Korenberg E, Gorelova N, Kovalevski YV, Bellenger E, Baranton G (1997) *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. Res Microbiol 148: 691-702
142. Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G (1998) Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). J Clin Microbiol 36: 3497-3504
143. Preac-Mursic V, Pfister HW, Spiegel H, Burk R, Wilske B, Reinhardt S, Bohmer R (1993) First isolation of *Borrelia burgdorferi* from an iris biopsy. J Clin Neuroophthalmol 13: 155-161
144. Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J (1989) Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. Infection 17: 355-359
145. Preac-Mursic V, Wilske B (1993) Biology of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) Aspects of Lyme borreliosis. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 44-58
146. Preac-Mursic V, Wilske B, Herzer P, Schierz G, Bauer M (1985) Acrodermatitis chronica atrophicans-- a borreliosis!. Hautarzt 36: 691-693
147. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G (1986) European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A] 263: 112-118
148. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G, Pfister HW, Einhaupl K (1984) Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. Eur J Clin Microbiol 3: 564-565
149. Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A (1997) An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 35: 685-690
150. Rasmussen R (2001) Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C., Nakagawara K (eds) Rapid Cycle Real Time PCR Methods and Application. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 21-34
151. Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T (2002) Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. J Clin Microbiol 40: 36-43
152. Reimer B, Marschang A, Fingerle V, Wilske B, Sonnenburg Fv, Hoecke Chv (1999) Epidemiology of Lyme Borreliosis in South-Eastern Bavaria (Germany). Zentralbl Bakteriell 289: 653-654
153. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J Exp Med 161: 332-344
154. Richter D, Schleier DB, Allgöwer R, Matuschka FR (2004) Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. Appl Environ Microbiol 11: 6414-6419
155. Rijpkema S, Golubic D, Molkenboer M, Verbeek-de Kruif N, Schellekens J (1996) 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 20: 23-30
156. Rijpkema SG, Herbes RG, Verbeek-de Kruif N, Schellekens JF (1996) Detection of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from roe deer (*Capreolus capreolus*) in The Netherlands. Epidemiol Infect 117: 563-566

157. Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF (1997) 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 3: 109-116
158. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem 245: 154-160
159. Rolfs A, Schuller I, Finckh U, Weber-Rolfs I (1992) PCR: Clinical diagnostics and research. Springer Verlag, Berlin,
160. Rosa PA, Schwan T, Hogan D (1992) Recombination between genes encoding major outer surface proteins A and B of *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 6: 3031-3040
161. Rosa PA, Schwan TG (1989) A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. J Infect Dis 160: 1018-1029
162. Rubio JM, Post RJ, van Leeuwen WM, Henry MC, Lindergard G, Hommel M (2002) Alternative polymerase chain reaction method to identify Plasmodium species in human blood samples: the semi-nested multiplex malaria PCR (SnM-PCR). Trans R Soc Trop Med Hyg 1: 199-204
163. Sachs L (1992) Statistische Entscheidungsfindung. In: Sachs L (ed) Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 29-306
164. Sadziene A, Thompson PA, Barbour AG (1996) A flagella-less mutant of *Borrelia burgdorferi* as a live attenuated vaccine in the murine model of Lyme disease. J Infect Dis 173: 1184-1193
165. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis K, Ehrlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. Science 239: 487-491
166. Saint-Girons I, Gern L, Gray JS, Guy EC, Korenberg E, Nuttall PA, Rijpkema SG, Schonberg A, Stanek G, Postic D (1998) Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. Zentralbl Bakteriol 287: 190-195
167. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467
168. SantaLucia J Jr, Allawi HT, Seneviratne PA (1996) Improved nearest-neighbour parameters for predicting DNA duplex stability. Biochemistry 35: 3555-3562
169. Schaible UE, Wallich R, Kramer MD, Gern L, Anderson JF, Museteanu C, Simon MM (1993) Immune sera to individual *Borrelia burgdorferi* isolates or recombinant OspA thereof protect SCID mice against infection with homologous strains but only partially or not at all against those of different OspA/OspB genotype. Vaccine 11: 1049-1054
170. Schlegel HG (1985) Allgemeine Mikrobiologie. 6. überarbeitete Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York,
171. Schmidt BL (1997) PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin Microbiol Rev 10: 185-201
172. Schmutzhard E, Stanek G, Pletschette M, Hirschl AM, Pallua A, Schmitzberger R, Schlogl R (1988) Infections following tickbites. Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis--a prospective epidemiological study from Tyrol. Infection 16: 269-272
173. Schneider BS, Zeidner NS, Burkot TR, Maupin GO, Piesman J (2000) *Borrelia* isolates in Northern Colorado identified as *Borrelia bissettii*. J Clin Microbiol 38: 3103-3105

174. Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson BJ, Wilske B (2003) Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 41: 1299-1303
175. Schwan TG, Piesman J (2000) 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* 38: 382-388
176. Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2909-2913
177. Sonenshine DE (1991) *Biology of ticks Vol 1*. Oxford University Press, New York:
178. Sonenshine DE (1993) *Biology of ticks Vol 2*. Oxford University Press, New York,
179. Stanek G, Satz N, Strle F, Wilske B (1993) Epidemiology of Lyme borreliosis. In: Weber K, Burgdorf WH (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 358-370
180. Steere AC (1989) Lyme disease. *N Engl J Med* 321: 586-596
181. Steere AC, Broderick TF, Malawista SE (1978) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am J Epidemiol* 108: 312-321
182. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson E, Malawista SE (1983) The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med* 308: 733-740
183. Steere AC, Malawista SE (1979) Cases of Lyme disease in the United States: locations correlated with distribution of *Ixodes dammini*. *Ann Intern Med* 91: 730-733
184. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA (1977) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* 86: 685-698
185. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Andiman WA (1976) A cluster of arthritis in children and adults in Lyme, Connecticut. *Arthritis Rheum* 19: 824
186. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20: 7-17
187. Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS (1998) Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 339: 209-215
188. Strle F, Picken RN, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljić E, Picken MM (1997) Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin Infect Dis* 25: 273-280
189. Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K (1981) *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6613
190. Thanassi WT, Schoen RT (2000) The Lyme disease vaccine: conception, development, and implementation. *Ann Intern Med* 132: 661-668
191. Trebesius K, Teufel C., Fingerle V., Wilske B. (2000) Typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by restriction fragment length polymorphism of the *ospA*-gene. In: Böck A., Heesemann J., Schleifer K.H., Wagner H. (eds) *Microbiology 2000: biospektrum*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp 14-15

192. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Dankert J (1993) Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* 17: 708-717
193. van Dam AP, Oei A, Jaspars R, Fijen C, Wilske B, Spanjaard L, Dankert J (1997) Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infect Immun* 65: 1228-1236
194. Van der Linde MR, Ballmer PE (1993) Lyme carditis. In: Weber K, Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 131-151
195. Vasiliu V, Herzer P, Rossler D, Lehnert G, Wilske B (1998) Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 187: 97-102
196. Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG (2002) Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. fetus. *J Clin Microbiol* 40: 4744-4747
197. Wang G, van Dam AP, Dankert J (1999) Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 37: 3025-3028
198. Wang G, van Dam AP, Dankert J (2000) Two distinct ospA genes among *Borrelia valaisiana* strains. *Res Microbiol* 151: 325-331
199. Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* 47: 926-932
200. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12: 633-653
201. Wang G, van Dam AP, Spanjaard L, Dankert J (1998) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. *J Clin Microbiol* 36: 768-776
202. Weber K, Schierz G, Wilske B, Preac-Mursic V (1985) Lymphocytoma--a borreliosis?. *Z Hautkr* 60: 1585-1598
203. Wetmur JG (1995) In: Meyer R (ed) *Molecular Biology and Biotechnology*. VCH Publishers Inc, New York, pp 605-608
204. Will G, Jauris-Heipke S, Schwab E, Busch U, Rossler D, Soutschek E, Wilske B, Preac-Mursic V (1995) 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
205. Wilske B (2002) Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33: 114-119
206. Wilske B, Bader L, Pfister HW, Preac-Mursic V (1991) Diagnosis of Lyme neuroborreliosis. Detection of intrathecal antibody formation. *Fortschr Med* 109: 441-446
207. Wilske B, Barbour AG, Bergstrom S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R (1992) Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res Microbiol* 143: 583-596
208. Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rossler D, Preac-Mursic V (1996) Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 184: 195-201

209. Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac M, V, Rossler D, Will G (1996) Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 24: 208-212
210. Wilske B, Fingerle V (2000) Therapy of Lyme borreliosis. Stage-appropriate antibiotic selection and dosage. *MMW Fortschr Med* 142: 32-33
211. Wilske B, Fingerle V, Hauser U, Rössler D (1997) Borrelien. *Diagnostische Bibliothek* 48: 1-12
212. Wilske B, Fingerle V, Herzer P, Hofmann A, Lehnert G, Peters H, Pfister HW, Preac-Mursic V, Soutschek E, Weber K (1993) Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 182: 255-270
213. Wilske B, Habermann C, Fingerle V, Hillenbrand B, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Pradel I, Rossler D, Schulte-Spechtel U (1999) An improved recombinant IgG immunoblot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 188: 139-144
214. Wilske B, Jauris-Heipke S, Lobentanzer R, Pradel I, Preac-Mursic V, Rossler D, Soutschek E, Johnson RC (1995) Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by monoclonal antibodies: relationship to genospecies and OspA serotype. *J Clin Microbiol* 33: 103-109
215. Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993) An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 31: 340-350
216. Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, Schwab E, Will G, Wanner G (1993) Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 61: 2182-2191
217. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G (1988) Lyme-Borreliose. *Die Gelben Hefte* Jg XXVIII 146-159
218. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV (1986) Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 263: 92-102
219. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Gueye W, Herzer P, Weber K (1988) Immunochemical analysis of the immune response in late manifestations of Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 267: 549-558
220. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour AG, Kramer M (1988) Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 539: 126-143
221. Wilske B, Schierz G, Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Einhaupl K (1984) Serological diagnosis of erythema migrans disease and related disorders. *Infection* 12: 331-337
222. Wilske B, Steinhuber R, Bergmeister H, Fingerle V, Schierz G, Preac-Mursic V, Vanek E, Lorbeer B (1987) Lyme borreliosis in South Germany. Epidemiologic data on the incidence of cases and on the epidemiology of ticks (*Ixodes ricinus*) carrying *Borrelia burgdorferi*. *Dtsch Med Wochenschr* 112: 1730-1736
223. Wilske B, Zöller L, Brade V, Eiffert M, Göbel UB, Stanek G, H.W.Pfister (2000) MiQ-12 Lyme-Borreliose. In: Mauch H, Lütticken R, Gatermann S (eds) Urban & Fischer Verlag, München, Jena,
224. Wilson SM, McNERNEY R, Nye PM, Godfrey-Faussett PD, Stocker N.G., Voller A (1993) Progress toward a simplified PCR and its application to diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 31: 776-782
225. Wisselink HJ, Joosten JJ, Smith HE (2002) Multiplex PCR assays for simultaneous detection of six major serotypes and two virulence-associated phenotypes of *Streptococcus suis* in tonsillar specimens from pigs. *J Clin Microbiol* 40 (8): 2922-2929

226. Wittwer C (2001) Introduction. In: Meuer S, Wittwer C., Nakagawara K (eds) Rapid Cycle Real Time PCR Methods and Application. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp 1-8
227. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-138
228. Wittwer CT, Ririe K, Rasmussen RP (1998) Fluorescence monitoring of rapid cycle PCR for quantification. In: Ferre F (ed) Gene quantification. Birkhauser, Boston,
229. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22: 176-181
230. Xu Y, Johnson RC (1995) Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *J Clin Microbiol* 33: 2679-2685

Spezies	Stamm	Lauf							
		1	2	3	4	5	6	7	
<i>B. garinii</i>	PKer							54,4	
	PKli							54,1	
	OspA-Typ 3	PBr	52,4		52,7-52,8	53	52,2	52,4	52,3
		PBe	52,6						
		PMek	52,5						
		PFr					51,9		
	OspA-Typ 4	PBi	59	57,8-58,3		58	57,24	57,1	57,1
		PRab	58						
		PVo					56,9		
		PWat					57,1		
OspA-Typ 5	PHei	56,9		57,4		56,7	56,5	56,7	
	PLi						56,8		
	PBu							56,5	
OspA-Typn 6	PWudII	46,5		46,6		46,3	46,4	46,3	
	PBet					46,2			
	PMit					46,2			
	PHez						46,3		
	PSes						46,2		
	PHe						46,3		
	PRa							46,3	
	PSes							46,2	
OspA-Typ 7	T25	52		52	52,1	51,6	51,6	51,5	
	PKuf					51,4			
<i>B. valaisiana</i>	VS116	49,5	49,7		49,62	49,6	49,5	49,6	
<i>B. lusitaniae</i>	PotiB2	48				47,8			

Anhang 2:

Sequenzalignment von *B. valaisiana* (M53), mit der Zecke Z319 und *Borrelia* A14S:

```

1                                     60
M53  atgaaaaaatattttattgggaatagggtctaataattagcattaatagcatgtaagcaaaat
A14S  atgaaaaaatattttattgggaatagggtctaataattagccttaatagcatgtaaacaaaat

61                                     120
M53  gtttagcagccttgacgaaaaaaaaacagcgttttcagtagatttgcttgggtaaatgaaagt
Z319  aaacagcacttcagtaaatgtacctgggggaacttaaagt
A14S  gtttagcggccttgacgagaaaaaacagcacttcagtagatgtacctgggggaacttaaagt

121                                    180
M53  tttgtaagt aaagaaaaagacaaagacggtaaaatacagtcctaatggcaacaatagacaag
Z319  cttgtaagcaaagaaaaggacaaagacggtaataacagcctaataaggcaacagtagacaag
A14S  cttgtaagcaaagaaaaggacaaagacggtaaaatacagcctaataaggcaacagtagacaag

181                                    240
M53  cttgagccttaaggaacttctgataaaaaacaatggttctgggtgcttgaagggtgtaaaa
Z319  cttgaactaaaaggaacttctgataaaaaatgatggttctgggtgactggaaggcgtaaaa
A14S  cttgaactaaaaggaacttctgataaaaaatgatggttctgggtgactggaaggcgtaaaa

241                                    320
M53  gctgacaaaagtaaaagtaaaattaacaatttctgatgatctagacgaaaccaaaacttgaa
Z319  gctgacaaaagtaaaagtaaaattaacaatttctgatcatttaagcaaaaccacatttgaa
A14S  gctgacaaaagtaaaagtaaaattaacaatttctgacatttaagaaaaccacatttgaa

321                                    400
M53  actttcaaagaagatggcaccaacattagtgtaagaaaagtaacccttaaaagacaagtca
Z319  gttttcaaagaagatggtaaaacattagtgtaagaaacgtaaatccaaagacatatca
A14S  gttttcaaagaagatggtaaaacattagtgtaagaaacgtaaatccaaagacaatca

401                                    480
M53  tcaacagaagaaaaatttgacgcaaaaagggtgctgcccgtaaactgaaaaagtaataadaaga
Z319  tcaacaaaagaaaaattcaatgaaaaagggtg aattgtctgaaaaaacattggtaaga
A14S  tcaacaaaagaaaaattcaatgaaaaagggtg aattgtctgaaaaaacattggtaaga

481                                    560
M53  aaagacggaaccagacttgaatacacaggaaatgaaaagtgatggaaacggaaaagctaaa
Z319  gcaaacagaaaccaaacttgaatacacagaaataaaaagcggatggaaccggaaaagctaaa
A14S  gcaaacggaaccaaacttgaatacacagaaataaaaagcggatggaaccggaaaagctaaa

561
M53  gaagtttttaaaaact
Z319  gaggttttaaaaagact
A14S  gaggttttaaaaagact

```

und = Mismatches:

Z319 und A14S: 7 / 416 (98%)

Z319 und M53: 65 / 416 (84%)

= *Hind*III-Schnittstelle

Anhang 3:

Rohdaten zu den untersuchten Zecken (OspA-Typ nach RFLP Analyse):

EG1 2000

Zecke	Stadium	OspA-Typ
60	A	4
62	A	6
63	A	2
66	A	4+6
67	A	6
68	A	1
74	N	6
75	N	4
79	N	6
85	N	6
89	N	6
92	N	6
93	N	4
95	L	4
113	L	4
116	N	4
122	N	1+4
124	N	4
125	N	4
126	N	6
131	A	6
134	A	4
138	L	4
143	N	1
150	A	1
153	A	4
156	N	2
157	N	4

EG2 2000

Zecke	Stadium	OspA-Typ
177	N	1+4
182	A	6
185	A	6
188	A	5
192	N	6
201	N	6
203	N	6
209	N	6
212	N	5
224	A	5
237	A	5

EG2 2001

Zecke	Stadium	OspA-Typ
258	N	2
271	N	2
272	N	2
277	N	2
311	A	6
313	A	4
316	A	1
319	A	A14S

EG1 2002

Zecke	Stadium	OspA-Typ
4	A	2
9	A	6
14	A	2
18	A	2
19	A	<i>B. valaisiana</i>
26	A	2
27	A	2
31	A	3

Tölz 2000

Zecke	Stadium	OspA-Typ
399	N	6
438	N	2
450	L	1
493	A	2+6
501	N	6
506	N	2
513	N	2
520	N	2
528	N	1+2
541	N	6
546	N	2
582	N	6

Anhang 4:

Rohdaten zu den Liquorisolaten:

Stamm	RFLP	Multiplex	LightCycler	Sequenzierung	Wertung
PAbe	1	<i>B.s.s.</i>	-	1	1
PDe	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PGI	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PHo	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PKu	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PMey	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PMi	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PMu	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PSE	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PSpm	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PTa	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PWag	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PFra	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PHas	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PStm	1	<i>B.s.s.</i>	1	1	1
PJe	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PStw	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PWee	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PWes	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PFca	2	<i>B.afz</i>	2	-	2
PGo	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PHa	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PKI	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PLap	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PStb	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PFr	3	<i>B.gar</i>	3	3	3
PVo	4	<i>B.gar</i>	4	4	4
PWat	4	<i>B.gar</i>	4	4	4
PLi	5	<i>B.gar</i>	5	5	5
PBet	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PBol	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PFu	6	<i>B.gar</i>	-	6	6
PGeb	6	<i>B.gar</i>	-	<i>B. bissettii</i>	<i>B. bissettii</i>
PHc	6	-	-	6	6
PMit	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PHez	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PSes	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PHe	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PKuf	1+7	<i>B.s.s.</i>	7	1+7	1+7
PMel	2+4+6	<i>B.afz/B.gar</i>	-	4	2+4+6

B. gar : *B. garinii**B. afz*: *B. afzelii**B.s.s.*: *B. burgdorferi* s.s.

- nicht mit der entsprechenden Methode typisiert.

Anhang 5:

Rohdaten zu den Erythema-Migrans Isolaten:

Stamm	RFLP	Multiplex	Light Cycler	Sequenzierung	Wertung
PTha	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PMar	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PPe	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PSca	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PSbh	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PSte	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PBuh	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PDoe	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PFoe	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PHoc	2	<i>B.afz</i>	2	-	2
PJa	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PKer	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PKli	2	<i>B.afz</i>	2	2	2
PFim	2	<i>B.afz</i>	-	2	2
PMoe	3	<i>B.gar</i>	-	3	3
PBu	5	<i>B.gar</i>	5	5	5
PRa	6	<i>B.gar</i>	6	6	6
PFri	6	<i>B.gar</i>	-	6	6

B. gar : *B. garinii**B. afz*: *B. afzelii*

- nicht mit der entsprechenden Methode typisiert

Anhang 6:

Rohdaten zu den Direktmaterialien:

Probe	Material	Klinik	RFLP- OspA-Typ	Multiplex Spezies	Sequenzierung OspA-Typ	Wertung OspA-Typ
P1	Haut	ACA	1	<i>B.s.s.</i>	1	1
P2	KGP	Arthritis	1	<i>B.s.s.</i>	1	1
P3	Liquor	Neurob.	1	<i>B.s.s.</i>	1	1
P4	Fruchtwasser	EM-Mutter	1	-	1	1
P5	Haut	atypisch	2	-	2	2
P6	Liquor	Neurob.	2	-	2	2
P7	KGP	Arthritis	2	-	2	2
P8	Haut	ACA	2	-	2	2
P9	Haut	EM	2	-	2	2
P11	KGP	Arthritis	2	<i>B. afz</i>	2	2
P12	Haut	EM	2	<i>B. afz</i>	2	2
P13	Haut	EM	2	-	2	2
P14	Haut	ACA	2	-	2	2
P15	Haut	EM	2	-	2	2
P16	Haut	EM	4	<i>B. gar</i>	4	4
P17	Haut	EM	4	<i>B. gar</i>	4	4
P18	Haut	atypisch	4	<i>B. gar</i>	4	4
P19	Haut	atypisch	4	<i>B. gar</i>	4	4
P20	Haut	EM	4	<i>B. gar</i>	4	4
P21	Liquor	Neurob.	6	<i>B. gar</i>	8	8

B. gar : *B. garinii**B. afz*: *B. afzelii**B.s.s.*: *B. burgdorferi* s.s.

- nicht mit der entsprechenden Methode typisiert

Anhang 7:

Zusammenfassung der im Zeitraum von 1984 bis 2002 am Max v. Pettenkofer Institut differenzierten Liquorisolatate:

Stamm	Alter	Studie		Spezies	OspA-Typ
		Wilske 96 *	diese Arbeit		
PKa2	63	1	-	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PFra	62	1	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PHas	40	1	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PStm	unbekannt	1	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PAbe	63	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PDe	9	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PGI	33	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PHo	57	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PKu	55	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PMey	61	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PMi	46	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PMu	67	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PSE	unbekannt	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PSpm	26	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PTa	32	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PWag	37	-	1	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	1
PKle	72	2	-	<i>B. afzelii</i>	2
PSpe	78	2	-	<i>B. afzelii</i>	2
PAIt	61	2	-	<i>B. afzelii</i>	2
PKr	48	2	-	<i>B. afzelii</i>	2
PHa	59	2	2	<i>B. afzelii</i>	2
PFca	26	2+4	2	<i>B. afzelii</i>	2
PGo	13	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PJe	64	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PKI	unbekannt	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PLap	63	2	2	<i>B. afzelii</i>	2
PStb	58	2	2	<i>B. afzelii</i>	2
PBo	16	2	-	<i>B. afzelii</i>	2
PStw	54	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PWee	41	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PWes	78	-	2	<i>B. afzelii</i>	2
PBr	35	3	-	<i>B. garinii</i>	3
PFe	24	3	-	<i>B. garinii</i>	3
PMek	19	3	-	<i>B. garinii</i>	3
PFr	73	-	3	<i>B. garinii</i>	3
PBi	14	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PFei	50	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PHoe	49	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PFin	64	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PBaEll	52	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PWa	76	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PMue	26	4	-	<i>B. garinii</i>	4

PSh	64	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PFIk	65	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PScf	60	4	-	<i>B. garinii</i>	4
PVo	55	-	4	<i>B. garinii</i>	4
PWat	87	-	4	<i>B. garinii</i>	4
PHei	8	5	-	<i>B. garinii</i>	5
PLi	2	5	5	<i>B. garinii</i>	5
PHe	2	6	6	<i>B. garinii</i>	6
PSoR	35	6	-	<i>B. garinii</i>	6
POhm	4	6	-	<i>B. garinii</i>	6
PSes	unbekannt	6	6	<i>B. garinii</i>	6
PBet	60	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PBoI	8	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PFu	11	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PHc	11	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PHez	54	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PMit	5	-	6	<i>B. garinii</i>	6
PBeS	6	7	-	<i>B. garinii</i>	7
PRef	44	7	-	<i>B. garinii</i>	7
PKi	44	8	-	<i>B. garinii</i>	8
PLa	3	8	-	<i>B. garinii</i>	8
PGeb	13	-	<i>B. bissettii</i>	<i>B. bissettii</i>	-
PKuf	3	-	1+7	-	-
PMel	23	-	2+4+6	-	-

* [208]

- in der entsprechenden Studie nicht typisiert.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Bettina Wilske für die Überlassung des Themas, die stets motivierende und vorbildliche wissenschaftliche Betreuung, sowie für ihre immerwährende Geduld und großzügige Unterstützung, die mir in Bezug auf die Durchführung dieser Arbeit sowie meiner weiteren wissenschaftlichen Ausbildung zuteil wurde.

Herrn Dr. med. Volker Fingerle danke ich ganz besonders herzlich für seine äußerst kompetente, geduldige und umfassende Betreuung, seine jederzeit unermüdliche Unterstützung und seine sehr hilfreichen Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Borrelien, Christiane Heimerl, Gereon Göttner, Ricki Schulte-Spechtel, Cezilia Hitzo-Teufel, Ruth Hillermann und Georg Hettche für die vielen hilfreichen Tips, Anregungen und Diskussionen, die Einarbeitung, Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. Udo Reischl von der Universität Regensburg und seinen Mitarbeitern für die gute Einarbeitung und die freundliche Beantwortung aller Fragen zur Arbeit mit dem LightCycler.

Bei Eva Bechert, Elke Michel und Georg Mößnang möchte ich mich herzlich für das geduldige Korrekturlesen und Tips bei der Erstellung des Manuskripts bedanken.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meinen Eltern bedanken die mir durch ihre Unterstützung mein Studium ermöglicht haben und durch ihr Vorbild, ihre Hilfe und Förderung zum Gelingen dieser Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen und Präsentationen:

Abstracts:

Michel, H., Hettche, G., Hizo-Teufel, C., Fingerle, V., Wilske, B., 2002. Distribution of different *Borrelia burgdorferi* OspA-types in European *Ixodes ricinus*, presented at the 'IX International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases', New York, USA

Michel, H., Hettche, G., Hizo-Teufel, C., Fingerle, V., Wilske, B., 2002. Distribution of different *Borrelia burgdorferi* OspA-types in European *Ixodes ricinus*, presented at the '54. Tagung der DGHM', Heidelberg

Michel, H., Fingerle, V., Haberhausen G., Reischl, U., Wilske, B., 2003. Rapid and reliable differentiation of relevant *Borrelia burgdorferi* OspA-types by LightCycler PCR. Int. J. Med. Microbiol. Wissenschaftliches Programm 55. DGHM-Tagung 29. September – 1. Oktober 2003 in Dresden.:293 Suppl 36(2003)DP016 S. 340

Fingerle, V., **Michel, H.**, Hettche, G., Hizo-Teufel, C., Wilske, B. 2003. *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-types are widely spread in Bavaria but show distinct local patterns, presented at the 'VII International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases', Berlin

Fingerle, V., **Michel, H.**, Feige, B., Weiler, S., Kessel, R., Hettche, G., Hizo-Teufel, C., Solbach, W., Wilske, B. 2003. Diversity of *Borrelia burgdorferi* s.l. species and OspA-types in *Ixodes ricinus* ticks from Germany. Int. J. Med. Microbiol. Wissenschaftliches Programm 55. DGHM-Tagung 29. September – 1. Oktober 2003 in Dresden.: 293 Suppl. 36(2003)MSV003 S. 138-139.

wissenschaftliche Publikationen:

Michel H., Wilske B., Hettche G., Gottner G., Heimerl C., Reischl U., Schulte-Spechtel U., Fingerle V., 2003. An ospA-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. Med Microbiol Immunol (Berl). 2004 Nov; 193(4):219-26.

Fingerle V., **Michel H.**, Hettche G., Hizo-Teufel C., Wilske B. 2004 *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. Int J Med Microbiol 2004 Apr, 293 Suppl 37:165-6.

Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Holger Michel
Adresse: Wirtstrasse 34, 81539 München
Geburtstag und -ort: 11.09.1977, Heidelberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schul- und Universitätsausbildung:

1988 - 1997 Dossenberger-Gymnasium Günzburg (Abitur, Gesamtnote: 1,6)
1994 - 1995 Austauschschüler an der Holt High School, Michigan, USA
1998 - 2000 vorklinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2000 Physikum (Gesamtnote: gut)
2000 - 2005 klinischer Studienabschnitt an der Ludwig-Maximilians-Universität München
2005 Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: sehr gut 1,16)

Dissertation:

seit 2001 experimentelle Doktorarbeit und Forschung am ‚Nationalen Referenzzentrum für Borrelien‘ (Leitung: Prof. Dr. med. B. Wilske) am Max v. Pettenkofer Instituts für Hygiene und Mikrobiologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
Thema: Entwicklung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden zur Spezies- und OspA-Typ-Differenzierung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Praktisches Jahr (2004 - 2005):

1. Tertial Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus München Harlaching, Zentrum für internistische Akutmedizin und Prävention (Leitung Dr. med. H. Pösl)
2. Tertial Pädiatrie am Dr. v. Haunerschen Kinderspital, München (Direktor Prof. Dr. Reinhardt)
3. Tertial Chirurgie am Städtischen Krankenhaus München Harlaching, Abteilung für Unfallchirurgie (Leitung Prof. Dr. Hertlein), Abteilung für Allgemein- und Visceralchirurgie (Leitung Prof. Dr. Horn)

Famulaturen:

2001 Innere Medizin, KKH Traunstein, vier Wochen Kardiologie (Leitung: Prof. Dr. W. Moshage), zwei Wochen Gastroenterologie (Leitung: Dr. med. A. Kreuzmayr)
2001 Pädiatrie, Praxisfamulatur, vier Wochen (Dr. med. F. Rübmann, München)
2002 Anästhesie, KH Oberstdorf, zwei Wochen (Leitung: Dr. med. M. Fiedermutz)
2003 Chirurgie KKH Günzburg, fünf Wochen (Leitung: Dr. med. C. v. Gottberg, Dr. med. D. Michel)
2003 Pädiatrie, Chirurgie, Innere Medizin, Bangalore Baptist Hospital, Karnataka, Indien, vier Wochen (Leitung: Dr. S. Benjamin)

München, den 20. Juni 2005