

IXODES RICINUS (IXODIDAE): SAISONALE AKTIVITÄT UND NATÜRLICHE INFEKTIONEN MIT DEM FSME-VIRUS AN AUSGEWÄHLTEN STANDORTEN IN BAYERN

ANNE MARTINA KUPČA



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

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

Angefertigt unter der Leitung von
Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder und Prof. Dr. Kurt Pfister

***Ixodes ricinus* (Ixodidae):
Saisonale Aktivität und natürliche Infektionen mit dem
FSME-Virus an ausgewählten Standorten in Bayern**

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

von
Anne Martina Kupča
aus Haan

München 2009

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Rinder

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermanns

Tag der Promotion: 6. Februar 2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Problemstellung	1
2.	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Ixodes ricinus</i>	3
2.1.1	Systematik.....	3
2.1.2	Morphologie.....	4
2.1.3	Geographische Verbreitung.....	5
2.1.4	Habitat.....	6
2.1.5	Entwicklungszyklus.....	7
2.1.6	Wirtsspektrum	9
2.1.7	Saisonale Aktivität	9
2.1.8	Bedeutung als Vektor	11
2.2	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME).....	14
2.2.1	Geschichtliches	14
2.2.2	Erreger-Taxonomie.....	14
2.2.3	Morphologie und Genomaufbau	16
2.2.4	Bedeutung und geographische Verbreitung	18
2.2.5	Situation der FSME in Deutschland.....	20
2.2.6	Krankheitsbild	22
2.2.7	Übertragungswege	24
2.2.8	Virus-Prävalenz in Zecken.....	27
3.	Material und Methoden	29
3.1	Standorte	29
3.1.1	Auswahl der Standorte	29
3.1.2	Charakteristika der Standorte.....	30
3.2	Sammeln der Zecken.....	35
3.3	Erfassen von Klima- und Wetterdaten	36

3.4	Laboruntersuchungen	37
3.4.1	Vorbereiten der Zecken	37
3.4.2	Extraktion der Gesamt-RNA	37
3.4.3	Untersuchungen mittels Polymerasekettenreaktion	38
3.4.4	Nachweis des FSME-Virus-Genoms	40
3.4.5	Nachweis der 16S rRNA von <i>I. ricinus</i>	41
3.4.6	PCR-Amplifikation und Sequenzierung des viralen E-Gens	43
3.4.7	Phylogenetische Analysen	45
3.5	Statistik	45
4.	Ergebnisse	47
4.1	Anzahl und saisonale Aktivität der Zecken	47
4.2	Wetterdaten	51
4.3	Vorkommen des FSME-Virus in den Zecken.....	54
4.4	Nachweis der 16S rRNA von <i>I. ricinus</i>	57
4.5	Sequenzanalysen des viralen E-Gens	57
4.6	Phylogenetische Analysen.....	60
5.	Diskussion	64
5.1	Diskussion der Ergebnisse zum Vorkommen und zur saisonalen Aktivität von <i>I. ricinus</i>	64
5.2	Diskussion der Ergebnisse des FSME-Nachweises sowie der Charakterisierung positiver Proben mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analysen	70
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	74
6.	Zusammenfassung.....	76
7.	Summary	77

8.	Literaturverzeichnis	78
9.	Abbildungsverzeichnis	97
10.	Tabellenverzeichnis	99
11.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	101
12.	Anhang	103
12.1	Tabellen	103
12.2	Regressionsanalysen.....	109
12.3	Sequenzanalysen	115
13.	Danksagung.....	121

1. Einleitung und Problemstellung

In Zentraleuropa stellt *Ixodes ricinus* die häufigste Zeckenart dar und hat als Vektor verschiedener Pathogene in der Human- und Tiermedizin Bedeutung. Ein wichtiger Krankheitserreger ist das Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME), das jährlich mehrere Tausend Krankheitsfälle in Europa verursacht, von denen durchschnittlich 1 bis 2 % tödlich verlaufen (Gritsun *et al.*, 2003). In Deutschland wird dabei eine Häufung der Krankheitsfälle in südlichen Regionen beobachtet. So lagen in den Jahren 2005 bis 2007 zwischen 34 % und 49 % der deutschlandweiten FSME-Fälle in Bayern. In den letzten Jahren scheint die FSME in Deutschland an Bedeutung zu gewinnen. Dabei wurden sowohl ein Anstieg der Fallzahlen als auch eine zunehmende geographische Ausbreitung mit neuen Naturherden, in denen das FSME-Virus endemisch vorkommt, registriert. Im Jahr 2003 traten z.B. an einem zuvor nicht betroffenen Standort im Landkreis Amberg-Weizsach erstmals Krankheitsfälle auf. Auch fiel hier in den folgenden Jahren die Häufung schwerer Fälle mit letalem Ausgang bei drei von neun erkrankten Personen auf (Böbenecker, 2007; Brey, 2007; K. Rausch, persönliche Mitteilung).

Die Ursachen für die steigenden Fallzahlen sind derzeit noch unklar. Eine mögliche Erklärung stützt sich auf die Hypothese, dass FSME-Naturherde nur an Standorten entstehen, an denen Larven und Nymphen der Vektorzecke *I. ricinus* synchrone Aktivitätsmuster aufweisen. Somit kommt es durch den gleichzeitigen Befall eines Wirtes zu einer effektiven Erregerübertragung zwischen den Zecken durch *Cofeeding* (Randolph *et al.*, 2000). Es stellt sich die Frage, ob veränderte Umweltbedingungen in den letzten Jahren zu einer Zunahme von Standorten mit entsprechenden Gegebenheiten geführt und somit die geographische Ausbreitung und eine steigende Zahl der FSME-Naturherde bewirkt haben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals in Bayern die saisonale Aktivität von *I. ricinus* in Kombination mit der Prävalenz des FSME-Virus in Zecken an ausgewählten Standorten untersucht.

Insbesondere wurden die folgenden Ziele verfolgt:

- Charakterisierung der saisonalen Aktivität der Larven, Nymphen und adulten Zecken von *I. ricinus* an fünf Standorten, die sich hinsichtlich ihrer aktuellen FSME-Risikoklassifizierung durch das Robert Koch-Institut unterscheiden
- Molekularbiologischer Nachweis und Bestimmung der Prävalenz des FSME-Virus in Zecken von diesen Standorten
- Weiterführende Charakterisierung der gefundenen Viren mittels Nukleinsäure-Sequenzierung der Region des E-Gens und anschließender phylogenetischer Analysen

Diese Arbeit wurde im Rahmen des EDEN-Projektes (*Emerging Diseases in a Changing European Environment*, Projektnummer: GOCE-CT-2003-010284 EDEN) angefertigt. Es handelt sich hierbei um ein Projekt des sechsten Rahmenprogramms der Europäischen Union, welches sich mit Auswirkungen von Umweltveränderungen auf ausgewählte Krankheitserreger befasst.

Obwohl Informationen zum Virusvorkommen in Zecken für die Risikobeurteilung grundlegend sind, wurden hierzu bisher nur wenige Studien an einzelnen Standorten durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten somit einen Beitrag zur Einschätzung des aktuellen Infektionsrisikos für FSME in Bayern leisten.

2. Literaturübersicht

2.1 *Ixodes ricinus*

2.1.1 Systematik

Taxonomisch zählen Zecken innerhalb des Stammes der Arthropoda (Gliederfüßer) zu der Klasse der Arachnida (Spinnentiere) und bilden zusammen mit den Milben die Unterklasse Acari. Durch die Lage der Stigmen (Atemöffnungen) hinter dem vierten Beinpaar grenzen sich die Zecken von den übrigen Milben ab und bilden die Ordnung Metastigmata oder Ixodida, die die zwei großen Familien Argasidae (Lederzecken) und Ixodidae (Schildzecken) beinhaltet sowie die in Afrika vorkommende Familie Nuttalliellidae, die nur durch eine einzige Art (*Nuttalliella namaqua*) repräsentiert wird (Sonenshine, 1991). Eine Übersicht über die Taxonomie der Zecken und die in Europa relevanten Gattungen gibt Tab. 1.

Tab. 1: Übersicht der Taxonomie der Zecken in Europa und relevante Gattungen (modifiziert nach Eckert *et al.*, 2005).

Stamm: Arthropoda
Klasse: Arachnida
Unterklasse: Acari
Ordnung: Metastigmata (Ixodida)

Familie:	Ixodidae	Argasidae
Gattungen:	<i>Amblyomma</i> <i>Boophilus*</i> <i>Dermacentor</i> <i>Haemaphysalis</i> <i>Hyalomma</i> <i>Ixodes</i> <i>Rhipicephalus</i>	<i>Argas</i> <i>Ornithodoros</i> <i>Otobius</i>

*nach neueren phylogenetischen Untersuchungen wird die Abgrenzung der Gattung *Boophilus* von *Rhipicephalus* als nicht gerechtfertigt angesehen (Murrell und Barker, 2003).

Ixodes ricinus Linnaeus, 1758, zuweilen als Holzbock bezeichnet, gehört der Familie Ixodidae an. Diese Art stellt in Mitteleuropa etwa 90 % der gesamten Zeckenfauna und ist somit die häufigste und bedeutendste Zeckenart dieser Region (Rufli und Mumcuoglu, 1981; Hillyard, 1996). Die Arbeit wird sich im Folgenden auf *I. ricinus* konzentrieren.

2.1.2 Morphologie

Der unsegmentiert erscheinende, dorsoventral abgeflachte Zeckenkörper besteht aus dem Capitulum, das aus der Basis Capituli und den Mundwerkzeugen gebildet wird, sowie dem Idiosoma, das sich aus dem die Beine tragenden Podosoma und dem Opisthosoma (Abdomen) zusammensetzt (Sonenshine, 1991). Der auf der Dorsalfläche befindliche chitinisierte Rückenschild (Scutum) ist ein für Schildzecken ebenso typisches Merkmal wie die von dorsal deutlich sichtbaren Mundwerkzeuge am kranialen Körperende. Sie bestehen aus dem unbeweglichen, zähnetragenden Hypostom, einem Paar Chelizeren und den beides umfassenden Pedipalpen (Sonenshine, 1991; Hillyard, 1996).

Die sechsbeinigen, gelblich durchscheinenden Larven von *I. ricinus* haben im ungesogenen Zustand eine Größe von etwa 0,5 mm. Dagegen messen Nymphen nüchtern bis zu 1,5 mm und besitzen ebenso wie das adulte Stadium vier Beinpaare. Adulte zeichnen sich im Gegensatz zu den juvenilen Stadien durch einen ausgeprägten Geschlechtsdimorphismus aus: Der etwa 2,6 mm lange Körper der Männchen ist von schwarzbrauner Farbe und trägt neben dem über das ganze Idiosoma reichenden Scutum auch auf der Ventralfläche sieben sklerotisierte Platten (Hillyard, 1996). Diese fehlen beim Weibchen, dessen rotbraunes Idiosoma auf die Aufnahme großer Mengen Blut und Gewebsflüssigkeit ausgerichtet ist und nur im ersten Drittel das herzförmige Scutum trägt. So kann die Körperlänge der Weibchen während der Blutmahlzeit von etwa 3,3 mm im nüchternen Zustand auf bis zu 1,1 cm anwachsen (Hillyard, 1996). Auf der Ventralfläche findet sich im hinteren Drittel des Idiosoma bei allen Stadien die Analöffnung, die kranial von der Analfurche umgeben wird. Bei adulten Zecken der Art *I. ricinus* liegt im vorderen Drittel, zwischen den Coxen des vierten Beinpaares, die Geschlechtsöffnung (Rufli und Mumcuoglu, 1981; Hillyard, 1996).

Die schwarzbraunen Beine sind distal mit je einem Paar Krallen und einem Haftlappen (Pulvillus) ausgestattet. Außerdem trägt das letzte Segment (Tarsus) des vorderen Beinpaars das Hallersche Organ, mit dessen Rezeptoren die Zecke thermische, chemische und mechanische Reize wahrnehmen kann und das somit der Orientierung und Wirtsfindung dient (Sonenshine, 1991). Die Morphologie der unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* zeigt Abb. 1.

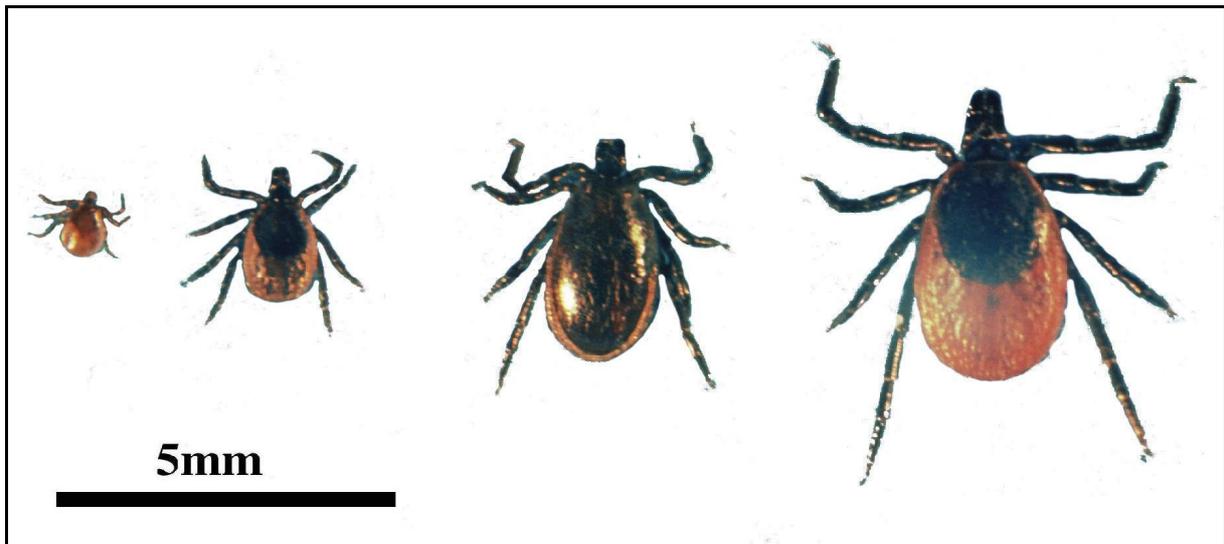


Abb. 1: Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus*: Larve, Nymphe, adultes Männchen, adultes Weibchen (von links)

(Quelle: <http://meduni09.edis.at/eucalb/>, 12.02.2008; mit freundlicher Genehmigung von J. Gray, EUCALB).

2.1.3 Geographische Verbreitung

I. ricinus ist im gemäßigten Klima Europas und Asiens sowie in Teilen Nordafrikas heimisch; das Verbreitungsgebiet erstreckt sich zwischen dem 39. und 65. Breitengrad und dehnt sich nach Osten bis zum 60. Längengrad aus (MacLeod, 1936a; Blaškovič, 1967; Sonenshine, 1993).

Die absoluten Grenzen des Verbreitungsgebiets von *I. ricinus* sind durch das herrschende Klima bedingt. Neben der Temperatur und Luftfeuchtigkeit hat auch die Höhenlage einen Einfluss auf das Zeckenvorkommen. Daniel (1993) beschrieb für

Zentraleuropa die Grenze für das Vorkommen von *I. ricinus* mit 700 m ü. NN, während Aeschlimann (1972) in der Schweiz auf einer Höhe von 600 m ü. NN zwar die größte Zeckendichte feststellte, aber auch in 1200 bis 1500 m ü. NN noch Individuen in geringerer Zahl beobachten konnte. In Tschechien durchgeführte Untersuchungen jüngerer Zeit haben gezeigt, dass dort nun, im Gegensatz zu dem im Jahr 1993 festgestellten Vorkommen bis zu 700 m ü. NN, auch in höhere Lagen bis zu 1100 m ü. NN Zecken zu finden sind (Daniel *et al.*, 2003).

2.1.4 Habitat

Bei der Beschreibung der abiotischen Faktoren eines Habitats ist generell zwischen Makroklima (den klimatischen Bedingungen der Region), Mesoklima (dem Klima in der Vegetationsschicht, z.B. innerhalb eines Waldes auf Höhe der Büsche und Gräser) und Mikroklima (dem Klima in unmittelbarer Bodennähe) zu differenzieren. Letzteres bedingt wesentlich die Entwicklung und das Überleben von *I. ricinus* und unterscheidet sich im Allgemeinen stark von dem Makroklima (Sonenshine, 1993).

Ausschlaggebend für ein geeignetes Habitat sind insbesondere die Faktoren Temperatur und Luftfeuchtigkeit (MacLeod, 1936a). *I. ricinus* ist sehr empfindlich gegen Austrocknung und kann ausschließlich in Biotopen überleben, in denen die relative Luftfeuchtigkeit an der Vegetationsbasis nur selten unter 85 % fällt (MacLeod, 1935a; Gray, 2002). Diese Bedingungen können z.B. in feuchtem Grasland, wie auf Weideflächen für Schafe in Großbritannien und Irland erfüllt sein. Typischerweise bieten aber vor allem Laub- und Mischwälder mit dichter Humusschicht und einer Vielzahl möglicher Wirte die idealen Lebensbedingungen für den Entwicklungszyklus dieser in Zentraleuropa beheimateten Zecken (Gray, 1991; Gray, 2002).

Habitate von *I. ricinus* liegen in der Regel in Gegenden mit einer jährlichen Durchschnittstemperatur von mindestens 8 °C und jährlich mindestens 800 mm Niederschlag (Grešiková und Calisher, 1989). Dabei muss allerdings bedacht werden, dass für die Luftfeuchtigkeit des Mikrohabitats weniger der Niederschlag als insbesondere die bodennahe Vegetation entscheidend ist (MacLeod, 1936a; Daniel, 1993).

I. ricinus ist eine wenig wirtsspezifische Zeckenart, daher ist das Wirtsspektrum eines Habitats nach den genannten abiotischen Faktoren nur von sekundärer Bedeutung für das lokale Vorkommen der Zecken und stellt in der Regel keinen limitierenden Faktor dar (MacLeod, 1936a; Randolph, 2000).

2.1.5 Entwicklungszyklus

Bei *I. ricinus* handelt es sich um eine exophile, dreiwirtige Zeckenart (Gray, 1991; Hillyard, 1996). Der zwei bis sechs Jahre (typischerweise 3 Jahre) dauernde Entwicklungszyklus umfasst vier Entwicklungsstadien: die Eier und die drei parasitischen Stadien Larven, Nymphen und Adulte (Sonenshine, 1993; Nuttall und Labuda, 1994). Dabei befinden sich die Zecken über 90 % ihres Lebens nicht auf einem Wirt (Nuttall und Labuda, 1994) sondern freilebend: entweder in der oberen Bodenschicht ihres Habitats, wo sie insbesondere vor Trockenheit geschützt sind, oder auf der Suche nach einem passenden Wirt (Hillyard, 1996). Hierzu erklimmt die Zecke die Vegetation, z.B. einen Grashalm, und streckt in charakteristischer Wartehaltung ihre Vorderbeine mit dem Hallerschen Organ aus (Sonenshine, 1993; Hillyard, 1996). Ein für einen Sekundenbruchteil bestehender Kontakt zu einem Wirt reicht aus um sich von ihm abstreifen zu lassen.

Larven, Nymphen und adulte Weibchen sind jeweils auf ein Blutmahl angewiesen, das mehrere Tage dauert und zu einer Gewichtszunahme um den Faktor 100 führt (Sonenshine, 1991; Hillyard, 1996). Dazu ritzt die Zecke durch laterale Bewegungen der Chelizeren zunächst die Epidermis an, um durch die entstehende Inzision nachfolgend das Hypostom einzuführen. Die Pedipalpen kommen währenddessen seitlich abgespreizt, flach auf der Haut zu liegen (Sonenshine, 1991). Der Zeckenspeichel bewirkt eine lokale Betäubung, die ein Abwehrverhalten des Wirtes vermeiden soll. Zudem bildet sich durch die enthaltenen vasodilatatorischen und gerinnungshemmenden Substanzen eine blutgefüllte Lakune, aus der die Zecke nun während mehrerer Tage (bis zu 12 Tagen bei Adulten) Gewebsflüssigkeit und Blut aufnimmt (Hillyard, 1996; Nuttall, 1998). Die Verankerung der Mundwerkzeuge im Wirt wird dabei durch die Zähne des Hypostoms sowie durch eine von den Speicheldrüsen abgesonderte Zementsubstanz gesichert (Sonenshine, 1991; Gray, 2002).

Adulte Männchen von *I. ricinus* saugen meist nicht und nehmen gegebenenfalls nur kleine Mengen Blut und Gewebsflüssigkeit auf (Nuttall und Labuda, 1994; Hillyard, 1996; Gray, 2002); nach der Paarung mit einem Weibchen, die entweder bereits auf der Vegetation oder auf dem Wirt stattfindet, sterben sie (Hillyard, 1996). Die vollgesogenen Zecken lösen sich vom Wirt und fallen auf den Boden, wo sie das Blutmahl verdauen und sich zum jeweils nächsten Stadium häuten oder im Fall der Weibchen 2000 bis 3000 Eier legen (MacLeod, 1935b; Hillyard, 1996). Der Entwicklungszyklus von *I. ricinus* ist in Abb. 2 dargestellt.

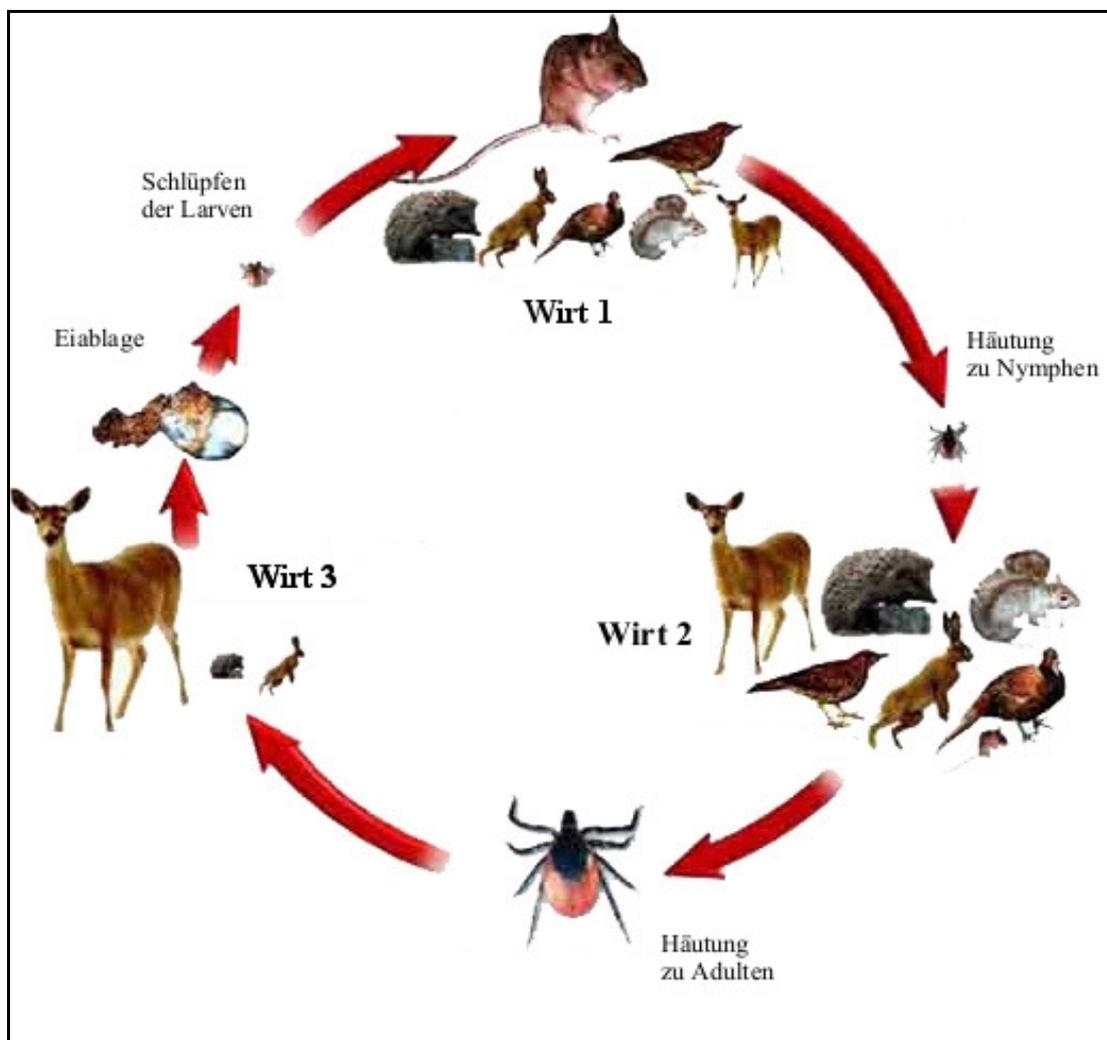


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus*

(Quelle: <http://meduni09.edis.at/eucalb/>, 12.02.2008, modifiziert).

2.1.6 Wirtsspektrum

Bei *I. ricinus* handelt es sich um eine euryxene Zeckenart, was bedeutet, dass sie viele unterschiedliche Wirtstiere befallen kann (über 200 verschiedene Arten). Dabei können juvenile und adulte Stadien sowohl auf verschiedenen als auch auf derselben Wirtstierart angetroffen werden. Neben Säugetieren und Vögeln dienen auch Reptilien (z.B. Eidechsen) als Wirte (Hillyard, 1996). Da sich die Entwicklungsstadien während der Wirtssuche auf unterschiedlichen Höhen in der Vegetation aufhalten (Mejlon und Jaenson, 1997), ergeben sich jeweils typische Wirte: Larven befinden sich in Bodennähe und werden bevorzugt auf Nagern und anderen Kleinsäugetern angetroffen. Wichtige Wirte dieses Stadiums sind z.B. Rötelmäuse (*Clethrionomys glareolus*), Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*), Waldmäuse (*A. sylvaticus*) und Waldspitzmäuse (*Sorex spp.*). Aktive Nymphen halten sich vor allem in Höhen von 30 bis 60 cm auf und befallen neben Kleinsäugetern auch Säuger mittlerer Größe sowie Vögel und Reptilien, während Adulte die Vegetation bis zu einer Höhe von 1,40 m erklimmen und insbesondere auf großen Wirtstieren wie z.B. Reh- oder Schwarzwild (*C. capreolus*, *Sus scrofa*) gefunden werden (Sonenshine, 1993; Hillyard, 1996; Mejlon und Jaenson, 1997; Gray, 2002). Alle Stadien von *I. ricinus* können auch auf dem Menschen angetroffen werden, wobei Studien gezeigt haben, dass Nymphen dabei den größten Anteil, vor Weibchen und Larven, ausmachen (Gray, 2002).

2.1.7 Saisonale Aktivität

In Zentraleuropa suchen die meisten Zecken der Art *I. ricinus* im Frühjahr und zu Anfang des Sommers nach Wirten, bevor ihre Aktivität in den Sommermonaten mit hohen Temperaturen und niedriger Luftfeuchtigkeit in der Regel absinkt (Kunz, 1992). Im Herbst wird im Allgemeinen ein zweites, kleineres Aktivitätsmaximum festgestellt (Aeschlimann, 1972; Blaškovič und Nosek, 1972; Gray, 2002). In anderen Regionen Europas wird anstatt dieses bimodalen Aktivitätsmusters eine unimodale Aktivitätskurve beobachtet (MacLeod, 1936a; Gray, 1991; Sonenshine, 1993). Dabei folgt die saisonale Aktivität von Larven, Nymphen und Adulten eines Habitats grundsätzlich demselben Muster (Sonenshine, 1993). Generell ist *I. ricinus* in Zentraleuropa in der Zeit von Ende März bis Oktober aktiv mit einem

Aktivitätsmaximum in den Monaten Mai und Juni (Gray, 1991; Randolph *et al.*, 1999; Lindgren *et al.*, 2000). Dieses Muster stimmt dabei mit dem saisonalen Auftreten einiger durch diese Zeckenart übertragener Krankheiten des Menschen wie z.B. der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis überein (Gray, 2002).

Die Aktivität von *I. ricinus* wird insbesondere durch die Gegebenheiten innerhalb des Habitats (Luftfeuchtigkeit und Temperatur, vgl. 2.1.4) gesteuert (Gray, 2002). So wird der jahreszeitliche Beginn der Wirtssuchaktivität laut MacLeod (1936a) durch das Überschreiten eines Schwellenwertes von 7 °C Durchschnittstemperatur in der Luft ausgelöst, wohingegen Lindgren *et al.* (2000) diesen Schwellenwert mit 4 bis 5 °C angeben. Optimale Temperaturen für die aktive Wirtssuche liegen nach MacLeod (1935a) zwischen 14 und 24 °C, dabei liegt innerhalb dieser Spanne die für Larven optimale Temperatur im Vergleich zu derjenigen der Nymphen etwas höher, während sich die Entwicklung der drei parasitischen Stadien von *I. ricinus* bei 15 bis 35 °C vollzieht (MacLeod, 1936b).

Die Aktivität und Entwicklung von *I. ricinus* sind mit optimalen klimatischen Bedingungen synchronisiert und werden während ungünstiger Gegebenheiten (in Zentraleuropa z.B. im Winter) eingestellt (Belozerov, 1982; Hillyard, 1996). Dieser als Diapause bezeichnete Zustand wird durch externe Stimuli, insbesondere durch die Tageslänge (Photoperiode) gesteuert (Belozerov, 1982; Sonenshine, 1991; Belozerov *et al.*, 2002). Zwei verschiedene Arten der Diapause sind zu unterscheiden: Während der sogenannten *behavioral diapause* unterlassen nüchterne Zecken die aktive Wirtssuche, wohingegen es in der *morphogenetic diapause* zu einer Verzögerung der Entwicklung z.B. beim Schlüpfen der Eier, der Eiablage oder bei der Häutung zum nächsten Stadium kommt (Belozerov, 1982; Sonenshine, 1993).

Neben saisonalen Rhythmen lassen sich auch circadiane Rhythmen in der täglichen Aktivität wie aktive Wirtssuche, Blutmahl, Lösen vom Wirt und Eiablage feststellen, die sowohl durch Photoperiodizität als auch durch Temperatur und Feuchtigkeit beeinflusst werden (Belozerov, 1982; Sonenshine, 1991; Wilson, 1994). So beschrieb Babenko (1974) Rhythmen in der Wirtssuchaktivität von *I. ricinus*-Nymphen als abhängig von der Sonneneinstrahlung, wobei die maximale Aktivität nachts festgestellt wurde. Bei adulten Zecken dieser Art hingegen scheint ein

entsprechender circadianer Rhythmus nicht deutlich ausgeprägt zu sein (Sonenshine, 1993).

2.1.8 Bedeutung als Vektor

Generell gelten Zecken nach Mücken als die wichtigsten Vektoren mikrobieller und viraler Krankheitserreger. Sie übertragen eine größere Erreger-Vielfalt als jede andere Gruppe der Arthropoden und haben somit große Bedeutung in der Human- und Tiermedizin (Sonenshine, 1991; Nuttall, 1998; Randolph, 2000). *I. ricinus* überträgt in den gemäßigten Breiten verschiedene Viren, Bakterien und Protozoen; darunter auch die Erreger der Zoonosen Borreliose, FSME, Ehrlichiose und Babesiose (Sonenshine, 1991; Gray, 2002). Tab. 2 zeigt eine Auswahl der von *I. ricinus* übertragenen Erreger.

Tab. 2: Auswahl der durch *Ixodes ricinus* übertragenen Erreger (modifiziert nach Eckert *et al.*, 2005).

Erregerart	Erreger	Krankheit	Wirt
Viren	FSME-Virus	FSME	Mensch, Cerviden, Fuchs, Rind, Schaf, Ziege, Hund
	Louping ill-Virus	Louping-ill	Schaf, (Mensch, selten)
Bakterien	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Granulocytäre Ehrlichiose	Mensch, Pferd, Schaf, Rind, Hund, Wühlmäuse
	<i>Rickettsia helvetica</i>	Pathogenität nicht gesichert	Mensch
	<i>Borrelia burgdorferi s. str.</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. afzelii</i> und weitere	Borreliose	Mensch, Rind, Schaf, Pferd, Hund, Katze, Nager
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Tick pyaemia	Lämmer
Protozoen	<i>Babesia divergens</i>	Babesiose	Rind, (Mensch, selten nachgewiesen)
	<i>Babesia microti</i>	Pathogenität nicht gesichert	Wühlmäuse, (Mensch, selten nachgewiesen)

Die geringe Wirtsspezifität, die eine Übertragung der Erreger zwischen verschiedenen Wirtstierarten ermöglicht, sowie die lange Verweildauer auf dem Wirt und die damit verbundene potentielle Verbreitung der Zecken und Krankheitserreger durch mobile Wirte, wie z.B. Vögel, machen *I. ricinus* zu einem effektiven Vektor (Blaškovič und Nosek, 1972; Hillyard, 1996; Labuda und Nuttall, 2004). Zudem wird auf Grund fehlender Verdauungsenzyme im Zeckendarm das Überleben von Mikroorganismen, die während einer Blutmahlzeit aufgenommen wurden, begünstigt (Gray, 2002). Die meisten Erreger penetrieren nach ihrer Aufnahme durch die Zecke die Darmwand und erscheinen in den Speicheldrüsen des folgenden Entwicklungsstadiums. Einige Erreger, z.B. *Borrelia sp.*, persistieren aber auch im Zeckendarm und migrieren erst während des Saugaktes des nächsten Stadiums zu den Speicheldrüsen (Gray, 2002). Damit stellt der Zeckenspeichel, der während eines Blutmahls ständig in die Wunde abgegeben wird, ein wichtiges Medium für die Erregerübertragung auf den Wirt dar (Gray, 2002; Labuda und Nuttall, 2004). Neben der Übertragung mit dem Zeckenspeichel können Erreger, die sich im Zeckendarm befinden, auch durch Regurgitieren der Zecke direkt in die Wunde gelangen. Eine weitere Infektionsmöglichkeit stellen mit dem Zeckenkot ausgeschiedenen Keime dar (Balashov, 1972).

Für das Fortbestehen eines Erregers innerhalb einer Zeckenpopulation haben die transovarielle sowie die transstadiale Übertragung Bedeutung. Einige Erreger, wie z.B. *Babesia divergens*, können bereits transovariell die Eier eines infizierten Weibchens befallen, wodurch die schlüpfenden Larven wiederum direkt zur Erregerübertragung auf einen Wirt fähig sind. Von transstadialer Übertragung spricht man, wenn die Infektion von der Larve an die Nymphe oder von der Nymphe an die adulte Zecke weitergegeben wird (Hillyard, 1996). Dieser Übertragungsweg ist z.B. für das Virus der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME) von Bedeutung. Eine weitere Möglichkeit stellt für einige Erreger (z.B. Rickettsien) auch die sexuelle Übertragung von einem infizierten Männchen auf das Weibchen während der Kopulation dar (Hayes *et al.*, 1980).

Lange betrachtete man nur Wirtstiere, die eine Virämie entwickelten, als infektiös für saugende Zecken. Es konnte aber gezeigt werden, dass dem als *Cofeeding* bezeichneten Mechanismus auch große Bedeutung zukommt (Gray, 2002; Gritsun *et al.*, 2003). *Cofeeding* bezeichnet die Übertragung eines Erregers zwischen Zecken

während des gleichzeitigen Saugaktes auf einem Wirtstier, ohne dass dieser über das Blut verbreitet wird (Jones *et al.*, 1987; Labuda *et al.*, 1993a). Erregertransmission durch *Cofeeding* wurde bei *I. ricinus* z.B. für das FSME-Virus (vgl. 2.2.7.) und für *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen (Alekseev und Chunikhin, 1990; Gern und Rais, 1996; Gray, 2002).

2.2 Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)

2.2.1 Geschichtliches

Die FSME kommt in weiten Teilen Europas und Asiens endemisch vor (Blaškovič, 1967; Monath, 1990; Ecker *et al.*, 1999) und gilt mit mehreren Tausend Krankheitsfällen pro Jahr als eine der wichtigsten und gefährlichsten vektorübertragenen Virus-Erkrankungen des Menschen (Monath, 1990; Nuttall und Labuda, 1994; Gritsun *et al.*, 2003). Das klinische Bild einer FSME wurde zuerst als „Meningitis serosa“ durch Schneider im Jahre 1931 in Österreich beschrieben. Nach weiteren Beobachtungen von Krankheitsfällen in Asien und Europa gelang 1937 die erste Virusisolierung in der ehemaligen Sowjetunion während einer Expedition unter Leitung von Zilber (Grešiková und Calisher, 1989; Kunz, 1992; Gritsun *et al.*, 2003). In Europa wurde das FSME-Virus zuerst 1948 in einem Labor isoliert, das im heutigen Tschechien liegt (Gallia *et al.*, 1949).

2.2.2 Erreger-Taxonomie

Der Erreger der Frühsommer-Meningo-Enzephalitis, das FSME-Virus, gehört zu den Arboviren (*arthropode-borne viruses*) (Labuda und Nuttall, 2004). Es handelt sich um ein RNA-Virus, das innerhalb der Familie Flaviviridae dem Genus *Flavivirus* angehört. Neben der Gruppe der durch Mücken übertragenen Erreger (*mosquito-borne viruses*) und einer zweiten Gruppe, für die keine Vektoren bekannt sind (*viruses with no known arthropod vector*), beinhaltet das Genus *Flavivirus* die für diese Arbeit relevante Gruppe der durch Zecken übertragenen Viren (*tick-borne viruses*). Innerhalb dieser Gruppe wird das FSME-Virus der *mammalian tick-borne virus group*, also der Untergruppe von Viren, die Säugetiere betreffen, zugeordnet (Labuda und Nuttall, 2004; Thiel *et al.*, 2005). Diese Einteilung der durch Zecken übertragenen Flaviviren gibt Abb. 3 wieder.

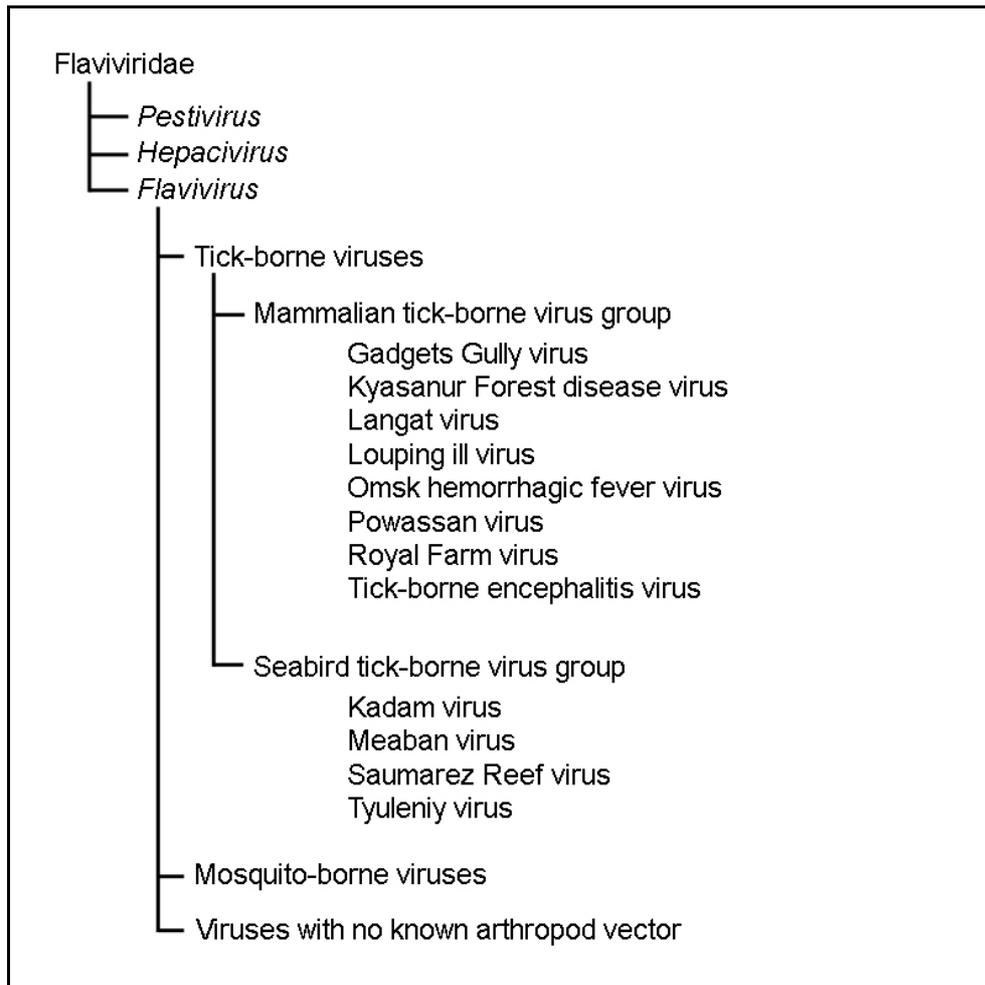


Abb. 3: Übersicht über die Gruppe der durch Zecken übertragenen Flaviviren (modifiziert nach Thiel *et al.*, 2005). Erläuterungen siehe Text, Kapitel 2.2.2.

Anhand serologischer und phylogenetischer Studien wird das FSME-Virus unterteilt in den Europäischen, den Fernöstlichen und den Sibirischen Subtyp (Thiel *et al.*, 2005). Lange Zeit waren nur der Europäische und der Fernöstliche Subtyp bekannt, die in der Literatur auch als *Central-European-Encephalitis-Virus* (CEEV) und als *Russian-Spring-Summer-Encephalitis-Virus* (RSSEV) beschrieben sind (Clarke, 1964; Nuttall und Labuda, 1994; Modrow *et al.*, 2003). Aus Sibirien stammende Virusisolate wurden erstmalig Ende der 90er Jahre als eigenständiger Subtyp klassifiziert (Pogodina *et al.*, 1981; Gritsun *et al.*, 1993a; Wallner *et al.*, 1995; Ecker *et al.*, 1999; Heinz, 2000; Hayasaka *et al.*, 2001).

2.2.3 Morphologie und Genomaufbau

Das FSME-Virus besitzt einen Durchmesser von etwa 50 nm und ist von einer Lipidhülle umgeben, in die das Envelope- und das Membran-Protein eingebettet sind. Im Inneren befindet sich das ikosaedrische Capsid, das die Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) enthält (Abb. 4) (Chambers *et al.*, 1990; Modrow *et al.*, 2003; Labuda und Nuttall, 2004).

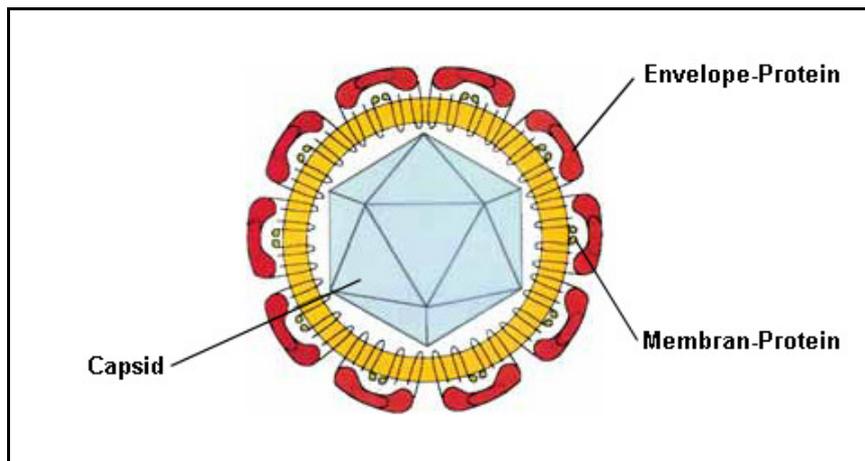


Abb. 4: Schematische Darstellung eines reifen FSME-Virus (Quelle: www.zecken.de, 18.12.2007, modifiziert).

Die Erbinformation liegt als einzelsträngige RNA positiver Polarität vor, die direkt infektiös ist (Gritsun und Gould, 1995; Thiel *et al.*, 2005). Bei einer Gesamtlänge von 11141 Basen (Stamm Neudoerfl) enthält sie in einem offenen Leserahmen die kodierenden Sequenzen für ein Polyprotein, das in drei strukturelle Proteine, das E-Protein (*Envelope*), das C-Protein (*Capsid*) und das prM-Protein (*precursor of Membrane*) sowie sieben nicht strukturelle Proteine gespalten wird (Kunz, 1992; Modrow *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2005). Dieser Leserahmen wird flankiert von zwei nicht kodierenden Regionen (*Non-Coding-Region*, NCR) (Abb. 5). Die 5'-NCR ist durch eine Cap-Gruppe modifiziert und etwa 130 Nukleotide (nt) lang, während die Länge der 3'-NCR je nach Genotyp von 350 bis 800 nt variieren kann (Wallner *et al.*, 1995; Modrow *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2005).

Die Hauptfunktion der sieben **Nicht-Struktur-Proteine** (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) ist die Replikation der viralen RNA in der Wirtszelle (Lindenbach

und Rice, 1999; Modrow *et al.*, 2003). So hat das NS5-Protein die Funktion einer RNA-Polymerase, während andere wichtige Funktionen der NS-Proteine z.B. in Protease- und Helikase-Aktivität (NS2B, NS3) sowie in der Einleitung der Zellmembran-Lyse (NS1) oder in der Assoziation mit Membranen (NS1, NS2A) bestehen (Chambers *et al.*, 1990; Heinz, 2003; Thiel *et al.*, 2005).

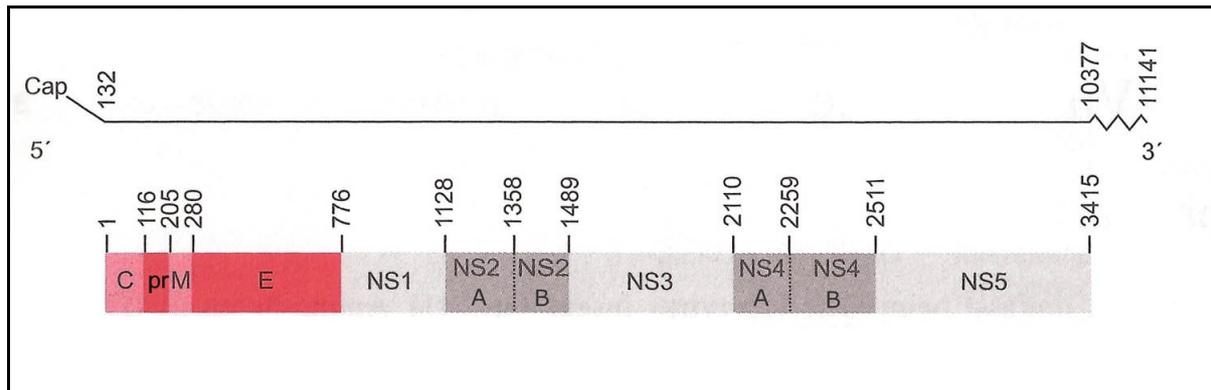


Abb. 5: Schematische Darstellung der Genomorganisation und Aufbau des Polyproteins des FSME-Virus (Stamm Neudoerfl). Strukturproteine sind in rot dargestellt; die Zahlenangaben entsprechen den Nukleotidpositionen des Genoms (oben) bzw. den Aminosäurepositionen des Polyproteins (unten) (modifiziert nach Modrow *et al.*, 2003).

Das C-Protein bildet das Capsid, das die RNA umhüllt und mit dieser zu einem Nucleocapsid interagiert (Modrow *et al.*, 2003). Unreife Virionen besitzen das prM-Protein, welches als Komplex mit dem E-Protein vorliegt. Im Zuge der Virus-Freisetzung aus der Wirtszelle wird dieser Komplex gespalten und das prM-Protein zu der reifen Form, dem M-Protein (**M**embran assoziiert), umgewandelt (Guirakhoo *et al.*, 1991; Thiel *et al.*, 2005).

Das Glykoprotein E stellt mit einer Größe von 50 bis 60 kDa einen Hauptteil der Virusoberfläche dar (Chambers *et al.*, 1990; Heinz, 2003) und erfüllt wichtige Funktionen bei der Erkennung von Rezeptoren und bei der für den Eintritt des Virus in die Wirtszelle nötigen Membranfusion (Mandl *et al.*, 1989; Gritsun *et al.*, 2003; Heinz, 2003; Thiel *et al.*, 2005). Rey *et al.* (1995) gelang es erstmals den dreidimensionalen Aufbau des E-Proteins mittels Röntgenbeugung darzustellen. Zunächst liegt das E-Protein als Dimer vor, bevor es sich, ausgelöst durch einen

sinkenden pH-Wert, zu einem Trimer umlagert und das Protein somit für den Fusionsprozess aktiviert wird (Rey *et al.*, 1995). Innerhalb des E-Proteins können drei Domänen unterschieden werden, die jeweils unterschiedliche antigene Eigenschaften und Strukturen besitzen und die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren (Mandl *et al.*, 1989; Chambers *et al.*, 1990; Rey *et al.*, 1995; Dumpis *et al.*, 1999; Heinz, 2003). Das E-Protein des FSME-Virus scheint der entscheidende Parameter für die Virulenz unterschiedlicher Virusisolate zu sein, da diese bereits durch Veränderung einer einzigen Aminosäure entscheidend beeinflusst werden kann (Holzmann *et al.*, 1990; Labuda *et al.*, 1994; Holzmann *et al.*, 1997; Modrow *et al.*, 2003).

2.2.4 Bedeutung und geographische Verbreitung

Das Verbreitungsgebiet des FSME-Virus erstreckt sich von Zentral- und Osteuropa über weite Teile Russlands bis nach China und Japan, wobei die verschiedenen Subtypen jeweils innerhalb des Verbreitungsgebietes der entsprechenden Vektorzecke vorkommen (*I. persulcatus* für den Fernöstlichen und den Sibirischen Subtyp, *I. ricinus* für den Europäischen Subtyp) (Grešiková und Calisher, 1989; Sonenshine, 1993). Zum Sibirischen Subtyp gehörende Stämme wurden vor allem in Zentralasien, in Sibirien, nachgewiesen, aber auch ein Vorkommen im Baltikum und in Finnland wurde beschrieben (Pogodina *et al.*, 1981; Ecker *et al.*, 1999; Hayasaka *et al.*, 2001; Bormane *et al.*, 2004; Jääskeläinen *et al.*, 2006). Die Verbreitung des Europäischen und des Fernöstlichen Subtyps ist in Abb. 6 dargestellt. Allerdings ist die Verteilung innerhalb des beschriebenen Gebietes nicht gleichmäßig und flächendeckend. Vielmehr kommt das Virus in Naturherden, sogenannten Foki, vor, innerhalb derer sich wiederum Mikrofoki identifizieren lassen (Blaškovič und Nosek, 1972; Kunz, 1992). In den letzten Jahren wurden einige neue Naturherde in Gegenden beschrieben, in denen zuvor kein FSME-Vorkommen bekannt war. Diese liegen insbesondere nördlich des bisher bekannten Verbreitungsgebietes, so dass eine durch die Erderwärmung bedingte Verschiebung der Risikogebiete nach Norden diskutiert wird (Lindgren *et al.*, 2000; Randolph, 2000; Haglund, 2002; Randolph, 2002).

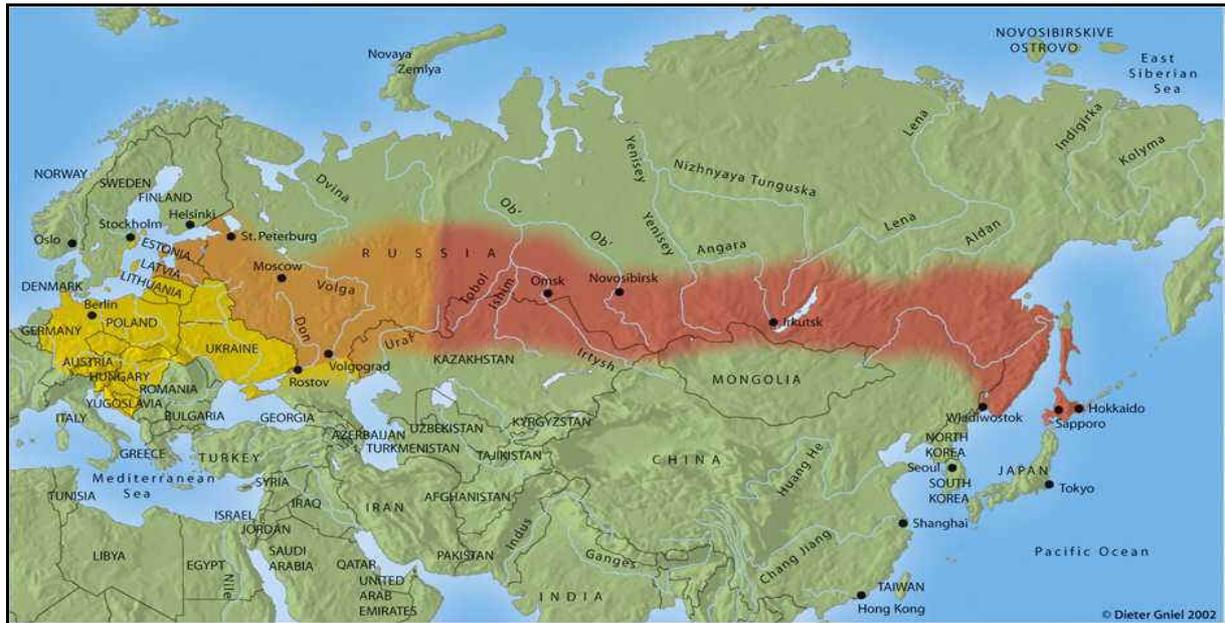


Abb. 6: Verbreitungsgebiet des Europäischen (gelb) und des Fernöstlichen Subtyps (rot) der FSME sowie das Gebiet, in dem beide Subtypen vorkommen (orange) (mit freundlicher Genehmigung von D. Gniel, Novartis Behring).

Jährlich ist das FSME-Virus in Europa für etwa 3000 humane Krankheitsfälle verantwortlich; in Russland liegt die Zahl der Erkrankungen, die vorwiegend durch Infektionen mit dem Fernöstlichen Subtyp hervorgerufen werden, bei jährlich 11000 (Grešiková und Calisher, 1989; Gritsun *et al.*, 2003). Dabei wurde in allen europäischen Ländern, die FSME-Endemiegebiete aufweisen, in den letzten 30 Jahren eine steigende Inzidenz beobachtet. Eine Ausnahme bildet Österreich, wo durch gezielte Programme eine hohe Durchimpfungsrate in der Bevölkerung erreicht wurde, was zu sinkenden Fallzahlen führte (Kunz, 1992; Süss *et al.*, 2006).

Im Bezug auf die steigende Zahl an Erkrankungen werden in der Literatur unterschiedliche Ursachen diskutiert. Hierzu zählen vor allem eine klimabedingte Ausbreitung der Risikogebiete sowie eine mögliche Veränderung der Virus-Pathogenität und Virulenz, die neben einem Anstieg der Zahl klinischer Erkrankungen einen schwereren Krankheitsverlauf bewirken könnte (Lindgren, 1998; Lindgren und Gustafson, 2001; Süss *et al.*, 2004; Dobler *et al.*, 2007). Aber auch weitere, in Kapitel 2.2.5 diskutierte Faktoren sind zu berücksichtigen.

2.2.5 Situation der FSME in Deutschland

Seit 2001 müssen FSME-Erkrankungen des Menschen in Deutschland gemäß §7 Abs. 1 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) an das Robert Koch-Institut (RKI) gemeldet werden (Süss *et al.*, 2004; RKI, 2006). Als Erfassungsgrundlage dient die durch das RKI bereitgestellte Falldefinition (Falldefinitionen des RKI, Ausgabe 2007; Quelle: [http://www.rki.de/cln_048/nn_467538/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition, 20.05.2008](http://www.rki.de/cln_048/nn_467538/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition,20.05.2008)). Dabei werden z.B. für die Einteilung von FSME-Risikogebieten diejenigen Erkrankungsfälle erfasst, die dem klinischen Bild einer Frühsommer-Meningo-Enzephalitis entsprechen und labordiagnostisch durch direkten oder indirekten Erregernachweis bestätigt wurden. Bis Ende des Jahres 2000 stammen Informationen über bestätigte autochthone FSME-Erkrankungen ausschließlich aus nicht einheitlichen Datensammlungen verschiedener Wissenschaftler, die durch das RKI zusammengeführt und aufbereitet wurden. Eine Meldepflicht bestand für diesen Zeitraum nicht (RKI, 2006). Auf Basis der Zahlen gemeldeter, autochthon erworbener FSME-Erkrankungen findet jährlich eine Klassifizierung der Stadt- und Landkreise in Risikogebiete durch das RKI statt. Bis 2006 wurde anhand absoluter Fallzahlen für den jeweiligen Kreis eine Unterscheidung in Risiko- und Hochrisikogebiete vorgenommen. Nach einer Änderung der Kriterien im Jahr 2007 wird nun das Risiko anhand der Inzidenz unter Einbeziehung der Kreisregion geschätzt, die Unterscheidung in Risiko- und Hochrisikogebiet entfällt. Die starke Zunahme der Zahl der Kreise, die im Jahr 2007 im Vergleich zum Jahr 2006 als Risikogebiete eingestuft wurden, kommt dabei durch den neuen Definitionsansatz zustande (RKI, 2007). Eine Gegenüberstellung der aktuell gültigen und der zuvor genutzten Definition zeigt Tab. 3. Derzeit sind 132 Land- und Stadtkreise Deutschlands als Risikogebiete ausgewiesen, 116 davon in Bayern und Baden-Württemberg; weitere Risikogebiete finden sich in Hessen, Thüringen und Rheinland-Pfalz (RKI, 2008).

Tab. 3: Kriterien für die Definition der Risikogebiete in Deutschland durch das Robert Koch-Institut (nach RKI, 2006; RKI, 2007).

Bis 2006 geltende Definition der Risikogebiete	Aktuelle Definition der Risikogebiete (gültig seit 2007)
<p>Als Risikogebiete gelten die Kreise, aus denen zwischen 1986 und 2005 innerhalb eines Jahres mindestens 2 oder innerhalb einer 5-Jahresperiode mindestens 5 FSME-Erkrankungen übermittelt wurden, die im Zusammenhang mit einer Zeckenexposition in dem betreffenden Kreis stehen. Als Hochrisikogebiete gelten diejenigen Risikogebiete, in denen in einer 5-Jahresperiode zwischen 1986 und 2005 mindestens 25 autochthon entstandene FSME-Erkrankungen beobachtet wurden.</p>	<p>Ein Kreis wird als FSME-Risikogebiet definiert, wenn die Anzahl der übermittelten FSME-Erkrankungen in einem Intervall von 5 Jahren in einem Kreis oder in der Kreisregion (bestehend aus dem betreffenden Kreis plus allen angrenzenden Kreisen) signifikant ($p > 0,05$) höher liegt als die bei einer Inzidenz von 1 Erkrankung pro 100000 Einwohner erwartete Fallzahl.</p>

In einigen östlichen Bundesländern war die FSME bereits von den 1960er Jahren bis Anfang der 1980er Jahre endemisch, die Erkrankungszahlen nahmen aber nach dieser Zeit drastisch ab (Süss *et al.*, 2004; RKI, 2008). Seit 2004 traten erstmals wieder vereinzelt Erkrankungen in Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Brandenburg auf. Daher ist es notwendig außer in den Risikogebieten Süddeutschlands auch im Nord- und Ostdeutschen Raum ein erhöhtes Bewusstsein für eine Erkrankung an FSME zu schaffen (RKI, 2008).

Deutschlandweit wurden zuletzt jährlich zwischen 200 und 550 autochthone klinische FSME-Fälle gemeldet, wobei seit 2002 die Fallzahlen stetig zunahmen und mit 546 Fällen in 2006 einen Höhepunkt erreichten, während im Jahr 2007 mit 238 Fällen wieder eine deutliche Abnahme zu verzeichnen war. Bis einschließlich August wurden im Jahr 2008 181 Fälle beim RKI registriert (Quelle: <http://www3.rki.de/SurvStat>, 12.10.2008). Dabei ist unsicher inwiefern diese Daten den tatsächlichen

Gegebenheiten entsprechen, da damit zu rechnen ist, dass klinisch geringgradige FSME-Erkrankungen nicht als solche erkannt und somit nicht gemeldet werden. Auch eine steigende Durchimpfungsrate der Bevölkerung könnte unabhängig von einem tatsächlichen Risiko zu verminderten Fallzahlen führen. Andererseits können z.B. eine erhöhte Aufmerksamkeit, Änderungen der Freizeitgestaltung und eine damit verbundene gesteigerte Exposition gegenüber Zecken, Schwankungen in der durch *I. ricinus* genutzten Wirtstierpopulation, eine steigende Zeckendichte oder eine Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten Ursachen für steigende Fallzahlen darstellen (Lindgren und Gustafson, 2001; Haglund, 2002; Randolph, 2002; Süss *et al.*, 2004; Dobler *et al.*, 2007). Untersuchungen zum Nachweis von Viren in Zecken oder Antikörpern bei Wildtieren, die als Virusreservoir eine Rolle spielen, sind von den genannten Einflussfaktoren unabhängig und daher grundsätzlich sehr gut geeignet, um Informationen über das Infektionsrisiko zu erhalten. Diese Untersuchungen sind aber sehr aufwändig und liegen meist nicht aktuell und nur für wenige Gebiete vor (Süss *et al.*, 2004; RKI, 2007; RKI, 2008).

2.2.6 Krankheitsbild

Infektionen des Menschen

Nur etwa ein Drittel aller mit dem Europäischen Subtyp des FSME-Virus infizierten Menschen erkrankt klinisch, die restlichen zwei Drittel der Infektionen werden in der Regel auf Grund eines subklinischen Verlaufs nicht erkannt (Modrow *et al.*, 2003). Krankheitsfälle treten gehäuft im Frühsommer und im Herbst auf, wobei sich in dieser saisonalen Erscheinung eine Übereinstimmung mit den Phasen maximaler Aktivität der Vektorzecken zeigt (Blaškovič, 1967; Grešiková und Calisher, 1989; Gritsun *et al.*, 2003; Dobler *et al.*, 2007). Das klinische Bild, das durch eine Infektion mit dem Europäischen FSME-Virus verursacht wird, ähnelt einer Sommergrippe: Nach einer Inkubationszeit von 7 bis 14 Tagen kommt es zu einer ersten klinischen Phase, die mit Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwäche, Myalgie, Hyperästhesie und mit leichtem Fieber von 38 bis 39 °C einhergeht (Kunz, 1992; Gritsun *et al.*, 2003). Bei etwa 25 % dieser Patienten verläuft die Erkrankung biphasisch und es tritt nach einer wenige Tage dauernden scheinbaren Erholung erneut Fieber auf. In dieser zweiten Erkrankungsphase kommen Symptome einer ZNS-Erkrankung in Form einer Meningitis,

Meningoenzephalitis oder Meningoenzephalomyelitis hinzu (Dumpis *et al.*, 1999). Der Krankheitsverlauf ist bei älteren Personen generell schwerer. Nach einer Infektion mit Europäischen FSME-Stämmen ist die Letalität mit durchschnittlich 1 bis 2 % (maximal 5 %) relativ gering (Grešiková und Calisher, 1989; Kunz, 1992; Gritsun *et al.*, 2003). Infektionen mit dem Fernöstlichen Subtyp verlaufen in der Regel schwerer und weisen eine deutlich höhere Letalität von 5 bis 20 %, in manchen Regionen sogar bis zu 60 %, auf (Sonenshine, 1993; Dumpis *et al.*, 1999; Gritsun *et al.*, 2003). Wissen über einen charakteristischen Krankheitsverlauf nach Infektion mit dem Sibirischen Subtyp ist sehr begrenzt (Lundkvist *et al.*, 2001), Bakhvalova *et al.* (2000) stellten in Untersuchungen aber eine im Vergleich zum Fernöstlichen Subtyp niedrigere Virulenz fest.

Da die FSME nur symptomatisch, nicht aber ursächlich behandelt werden kann, kommt der Prävention ein hoher Stellenwert zu. Neben entsprechender Kleidung und dem Auftragen von Repellents, um Stiche der Vektor-Zecken zu vermeiden, besteht seit 1976 die Möglichkeit sich durch eine Impfung vor dem FSME-Virus zu schützen (Kunz, 1992). Seitdem wurde in Österreich durch ein Impfprogramm eine hohe Durchimpfungsrate der Bevölkerung erreicht. Dies führte, im Gegensatz zu dem in anderen europäischen Ländern beobachteten Trend, zu einem stetigen Absinken der Inzidenz humaner Krankheitsfälle (Gritsun *et al.*, 2003; Süss *et al.*, 2006).

Infektionen der Tiere

Bei Untersuchungen verschiedener Wildtiere, z.B. Reh (*Capreolus capreolus*), Rothirsch (*Cervus elaphus*) und Wildschwein (*S. scrofa*), konnten sowohl Virus-RNA isoliert als auch spezifische Antikörper nachgewiesen werden, im Allgemeinen handelt es sich hierbei aber um ein symptomloses Trägertum (Grešiková und Calisher, 1989). Kleinwühlmäuse (*Pitymys subterraneus*) allerdings, die in Süddeutschland nur selten und bevorzugt in Höhenlagen zwischen 1000 m und 1500 m vorkommen, scheinen hoch empfänglich für das FSME-Virus zu sein und entwickeln eine ausgeprägte Virämie. Unter Versuchsbedingungen wurde gezeigt, dass bei dieser Art im Gegensatz zu vielen natürlichen Wirten eine Infektion tödlich verläuft und die Tiere häufig sterben bevor die saugenden Zecken ihr Blutmahl beendet haben (Nuttall, 1998). Bei Gelbhalsmäusen (*A. flavicollis*) und Brandmäusen (*A. agrarius*) konnte dagegen unter denselben Bedingungen keine oder nur eine geringe Virämie festgestellt

werden. Ebenso zeigten sich andere von *I. ricinus* als Wirte genutzte Tiere als resistent gegen eine Infektion. Dies konnte in Untersuchungen für Igel (*Erinaceus europaeus*), Fasane (*Phasianus colchicus*) und Amseln (*Turdus merula*) gezeigt werden (Nuttall, 1998).

Bei Hunden konnten sowohl experimentell eine niedrige Virämie bei subklinischer Infektion erzeugt als auch einzelne natürliche Infektionen beobachtet werden (Grešiková und Calisher, 1989). Letztere stellten sich klinisch in akuten neurologischen Symptomen mit Gleichgewichtsstörungen, Übererregbarkeit, Krämpfen, Wesensveränderungen, Lähmungserscheinungen und erhöhter Körpertemperatur dar, während histologisch eine disseminierte Leptomeningitis und Enzephalitis beschrieben wurden (Grešiková *et al.*, 1972; Wandeler *et al.*, 1972; Tipold *et al.*, 1993; Weissenböck, 1999). Von Reiner und Fischer (1998) wurden zwei Fälle natürlicher Infektionen beim Hund für den süddeutschen Raum beschrieben, wobei eine Infektion durch Zeckenstiche im Kreis Oberpfaffenhofen bzw. im Raum Nürnberg wahrscheinlich erschien. Im Gegensatz zu den übrigen in der Literatur vorhandenen Fällen, in denen die erkrankten Hunde starben oder aufgrund einer ungünstigen Prognose euthanasiert wurden, wurde in einem Fall durch die hier durchgeführte antikonvulsive und antipyretische Therapie kombiniert mit intensiver unterstützender Betreuung eine vollständige Heilung erzielt, im zweiten Fall persistierte nach initialer Besserung der Symptomatik eine Parese der Vordergliedmaßen.

2.2.7 Übertragungswege

Für den Menschen kommen als Infektionswege neben dem Zeckenstich auch alimentäre Infektionen durch den Genuss roher Schaf- und Ziegenmilch (gelegentlich auch Kuhmilch) sowie daraus hergestellter Produkte in Frage (Blaškovič, 1967; Grešiková *et al.*, 1975; Monath, 1990; Kunz, 1992). Des Weiteren wurden Infektionen im Labor durch Inhalation oder Stichverletzungen während der Tätigkeit mit infektiösem Material beschrieben (Grešiková und Calisher, 1989; Avšič-Županc *et al.*, 1995; Gritsun *et al.*, 2003). Die Hauptinfektionsquelle stellen aber infizierte Zecken der Art *I. ricinus* für den Europäischen Subtyp und *I. persulcatus* für den Fernöstlichen und Sibirischen Subtyp dar (Blaškovič, 1967; Nuttall und Labuda, 1994). Auch weitere Zeckenarten verschiedener Gattungen, z.B. *Rh. appendiculatus*,

H. concinna und *D. marginatus*, wurden unter experimentellen Bedingungen als kompetente Vektoren des FSME-Virus charakterisiert. Allerdings bleiben Virus-Isolationen unter natürlichen Bedingungen selten, so dass sie als sekundäre oder nicht natürliche Vektoren (da sich ihr Verbreitungsgebiet nicht mit dem des Virus deckt) eingestuft wurden (Blaškovič und Nosek, 1972; Grešiková und Calisher, 1989; Nuttall und Labuda, 1994; Gritsun *et al.*, 2003).

Übertragungszyklen in der Natur werden durch Interaktionen zwischen Virus, Vektor und Wirt bestimmt. Sie sind damit von deren Biologie und Populationsdynamik abhängig, die ihrerseits durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst werden (Nuttall und Labuda, 1994; Nuttall, 1999). In der Zeckenpopulation wird das Virus transstadial auf das jeweilige nächste Stadium übertragen, eine betroffene Zecke bleibt so während ihres gesamten Lebenszyklus infiziert (Benda, 1958; Gritsun *et al.*, 2003). Auch eine transovarielle Übertragung des FSME-Virus, mit Weitergabe des Erregers auf die nächste Zeckengeneration, wurde beschrieben. Das Ausmaß dieses Übertragungsweges, ermittelt in Transmissionsexperimenten und mittels PCR-Untersuchungen, ist aber unter natürlichen Bedingungen mit einer Infektionsrate von unter 1 % der Larven eines Geleges gering (Benda, 1958; Rehaček, 1962; Monath, 1990; Danielova und Holubova, 1991; Labuda *et al.*, 1993a). Insgesamt können Zecken als Langzeit-Reservoir für das FSME-Virus angesehen werden, da sie unabhängig von der Anwesenheit bestimmter Wirtstiere ein Fortbestehen des Virus durch die Übertragung zwischen Zecken sowie auf Grund ihres mehrere Jahre dauernden Lebenszyklus über eine lange Zeit gewährleisten (Grešiková und Calisher, 1989).

Eine Übertragung des Virus auf Wirte findet während des Saugaktes mit dem Zeckenspeichel statt. Für das Fortbestehen der Virus-Zirkulation in der Natur spielen Kleinnager und Insektivoren, insbesondere Kleinsäuger der Gattungen *Apodemus*, *Clethrionomys* und *Microtus*, eine wichtige Rolle (Grešiková und Calisher, 1989; Sonenshine, 1993; Nuttall und Labuda, 1994). Sie werden von einer großen Zahl an Larven als Wirtstiere genutzt, die das Virus während der Virämie mit dem Blut des Wirtes aufnehmen und dann transstadial auf das folgende Entwicklungsstadium, die Nymphe, übertragen. Eine weitere Möglichkeit stellt die Übertragung durch *Cofeeding* dar, wobei das Virus während des gleichzeitigen Saugaktes zwischen Zecken übertragen wird, ohne dass das Wirtstier eine Virämie ausbilden muss. Andere als die oben genannten Wirte, z.B. größere Säuger, Vögel oder Reptilien,

sind von untergeordneter Bedeutung für den Übertragungszyklus des FSME-Virus, da sie im Allgemeinen von geringeren Mengen Larven (und Nymphen) befallen werden. Größere Säuger sind aber als Wirte der Adulten wichtig für die Aufrechterhaltung der Zeckenpopulation (Nuttall und Labuda, 1994).

Die Übertragung des FSME-Virus via *Cofeeding* wurde zuerst durch Alekseev und Chunikhin (1990) beschrieben und nachfolgend durch weitere Autoren untersucht (Labuda *et al.*, 1993b; Labuda *et al.*, 1993c; Nuttall, 1998; Randolph *et al.*, 2000). Dabei wird von einer großen Bedeutung dieses Übertragungsweges für die Verbreitung des FSME-Virus in einer Zeckenpopulation ausgegangen (Labuda *et al.*, 1993c; Randolph *et al.*, 1999). Ideale Bedingungen werden vor allem bei Kleinsäufern gefunden, bei denen zumeist eine große Zahl Larven sowie einzelne Nymphen im Bereich der Ohren saugen. Dadurch kann das Virus auch von nur einer infizierten Zecke gleichzeitig auf viele andere übertragen werden (Randolph *et al.*, 1999).

Die Bedeutung der transvariellen Übertragung ist in diesem Zusammenhang umstritten. So beschreiben Danielova *et al.* (2002b), dass durch das gemeinsame Auftreten vieler Larven auf demselben Wirt, Erreger durch *Cofeeding* in einem großen Teil der Larven-Generation verbreitet werden. Somit hätte die transvarielle Übertragung eine epidemiologische Relevanz, da bereits wenige infizierte Eier und die daraus schlüpfenden Larven ausreichen, um eine hohe Infektionsrate zu erzielen. Randolph *et al.* (2000) messen dagegen der transvariellen Übertragung eine geringe Bedeutung zu. Sie sehen einen zeitgleichen Aktivitätsbeginn und folgende zeitgleiche Aktivitätsmaxima von Nymphen und Larven als Bedingung für eine effiziente Virusübertragung via *Cofeeding*, die somit von infizierten Nymphen auf die Larven stattfinden kann. Eine solche Synchronisierung dieser Entwicklungsstadien findet nur in einigen Gegenden des Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* statt und könnte eine Erklärung für das fokale Vorkommen der FSME-Naturherde liefern (Labuda und Randolph, 1999; Randolph, 2000; Randolph *et al.*, 2000). Als ausschlaggebend für einen gleichzeitigen Aktivitätsbeginn werden die klimatischen Gegebenheiten im Herbst vermutet: durch einen schnellen Temperaturabfall werden geschlüpfte Larven aus Gelegen desselben Jahres nicht aktiv, sondern überwintern in Diapause, so dass ihre Aktivität im Frühjahr des folgenden Jahres, ausgelöst durch ansteigende Temperaturen, direkt und zeitgleich mit der Aktivität der Nymphen einsetzen kann (Randolph, 2000; Randolph *et al.*, 2000; Randolph, 2002).

2.2.8 Virus-Prävalenz in Zecken

Das Risiko sich in einem Endemie-Gebiet mit dem FSME-Virus zu infizieren wird maßgeblich durch die in einer Zeckenpopulation vorhandene Anzahl Virus-tragender Zecken bestimmt. Untersuchungen zur Prävalenz des FSME-Virus in nüchternen Zecken sind daher sehr gut als Basis für eine Risikoabschätzung geeignet (Danielova *et al.*, 2002a; RKI, 2007). Erste Untersuchungen zum Virus-Vorkommen in *I. ricinus* in Süddeutschland wurden 1964 von Scheid *et al.* beschrieben. Seitdem wurden verschiedene weitere Untersuchungen in jeweils räumlich begrenzten Gebieten durchgeführt, es fehlen aber systematische, flächendeckende Studien (RKI, 2007; RKI, 2008). Eine zusammenfassende Darstellung von Daten zur Prävalenz des FSME-Virus in *I. ricinus* in Deutschland und benachbarten Ländern bietet Tab. 4. Aufgrund verschiedener Faktoren sind die Ergebnisse allerdings nur bedingt vergleichbar. So wurden z.B. unterschiedliche Nachweismethoden verwendet oder zum Teil gezielt Standorte mit einer Häufung humaner Krankheitsfälle ausgewählt. Übereinstimmend lassen sich jedoch für den süddeutschen Raum Infektionsraten von 0 % bis maximal 5 % für Zecken, die von der Vegetation gesammelt wurden, feststellen (Tab. 4).

Für das Vorkommen des Fernöstlichen Subtyps in *I. persulcatus* werden in der Literatur vergleichsweise hohe Prävalenzen von bis zu 40 % beschrieben (Nuttall und Labuda, 1994; Korenberg *et al.*, 2001; Bormane *et al.*, 2004). Generell wurden in adulten Zecken höhere Infektionsraten als in juvenilen Stadien festgestellt. Dies ist durch die steigende Wahrscheinlichkeit, das Virus entweder während der Blutmahlzeit aufzunehmen oder es transstadial vom vorhergehenden Stadium zu erhalten, also einen kumulativen Effekt, zu erklären (Rehse-Küpper *et al.*, 1978; Sonenshine, 1993). Auch fallen starke regionale Unterschiede auf, die in der fokalen Verbreitung des Virus begründet sind.

Einzelne Untersuchungen beschäftigen sich neben der Bestimmung von Infektionsraten nüchterner Zecken auch mit Zecken, die bereits den Saugakt am Menschen begonnen haben. In einigen, nicht aber in allen Fällen, konnte in solchen bereits gesogenen Zecken eine deutlich höhere Prävalenz festgestellt werden, was die Autoren mit dem Einsetzen der Virus-Vermehrung in den Zecken nach Beginn der Blutmahlzeit erklären (Korenberg *et al.*, 2001; Bormane *et al.*, 2004; Süss *et al.*, 2004; Süss *et al.*, 2006).

Tab. 4: Vergleichende Darstellung von Untersuchungen zur Prävalenz des FSME-Virus in nüchternen *Ixodes ricinus*-Zecken (L: Larven, N: Nymphen, A: Adulte, n.a.: nicht angegeben).

Ort	Jahr	Virus-Prävalenz in %	Nachweisverfahren*	Anzahl (Stadium)	Referenz
Österreich	1961 / 1962	< 1	3	19163 (L,N,A)	Radda <i>et al.</i> (1963)
Süd-Deutschland	1962	0	1	666 (n.a.)	Scheid <i>et al.</i> (1964)
Slowakei, Tschechien, Ungarn	1964 - 1966	0 - 0,9 0 - 8,3	3	3654 (N) 2181 (A)	Grešiková <i>et al.</i> (1968)
Schweiz	1973	0 0,19	2	2542 (N) 528 (A)	Radda <i>et al.</i> (1974)
Bayern	1974 / 1975	0,18	n.a.	8407 (n.a.)	Rehse-Küpper <i>et al.</i> (1976)
Baden-Württemberg	1974 / 1975	0,04	n.a.	4676 (n.a.)	Rehse-Küpper <i>et al.</i> (1976)
Bayern / Baden-Württemberg	1972 - 1976	0,76 3,6	2	11954 (N) 2738 (A)	Rehse-Küpper <i>et al.</i> (1978)
Deutschland	1992	0,03	5	7200 (n.a.)	Ramelow <i>et al.</i> (1993)
Deutschland	n.a.	0,04	5	22273 (n.a.)	Süss <i>et al.</i> (1996)
Saarland	n.a.	0,03	5	8780 (n.a.)	Süss <i>et al.</i> (1996)
Baden-Württemberg	1996	0,17 0,46	5	1212 (N) 653 (A)	Eistetter <i>et al.</i> (1998)
Finnland	1996 / 1997	0,34	5	589 (n.a.)	Han <i>et al.</i> (2001)
Baden-Württemberg	1998 - 2000	0 - 2,3	5	9189 (n.a.)	Oehme <i>et al.</i> (2002)
Süd-Böhmen (Tschechien)	2000	0,2 - 1,3 5,9 - 11,1	4	2725 (N) 243 (A)	Danielova <i>et al.</i> (2002a)
Bayern / Baden-Württemberg	1997 - 2002	0 - 3,4 0 - 5,3	5	18360 (N) 3350 (A)	Süss <i>et al.</i> (2004)
Lettland	1995 - 2002	1,7 - 26,6	6	4814 (A)	Bormane <i>et al.</i> (2004)
Bayern	2003	0	5	1552 (L,N,A)	Kiessling (2005)

* verwendete Nachweisverfahren: 1: Tiermodell; 2: Tiermodell und nachfolgende serologische Tests; 3: Tiermodell, Zellkultur und nachfolgende serologische Tests; 4: Zellkultur und nachfolgende serologische Tests; 5; verschiedene RT-PCR-Verfahren; 6: Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay

3. Material und Methoden

3.1 Standorte

3.1.1 Auswahl der Standorte

Da im EDEN-Projekt vorgesehen war, Sammelgebiete mit unterschiedlichem FSME-Risiko einzubeziehen, wurden bei der Standortwahl die auf humanen Krankheitsfällen basierende FSME-Risikoklassifizierung durch das Robert Koch-Institut sowie die jeweilige Fallzahlentwicklung der letzten Jahre berücksichtigt. So wurden fünf Standorte gewählt, die in den folgenden Land- oder Stadtkreisen liegen: München, Dachau, Rosenheim, Amberg-Sulzbach und Passau (<http://www3.rki.de/SurvStat/>, 22.05.2008; RKI, 2005; RKI, 2006). Ein ausreichendes Zeckenvorkommen an diesen Orten wurde durch die Auswahl von für Zecken geeignet erscheinenden Habitaten in Laub- oder Mischwäldern mit ausgeprägtem Untergrundbewuchs sowie durch Probesammlungen abgesichert.

Die Standorte München und Dachau liegen in Kreisen, die bei Beginn der Untersuchungen im April 2006 nicht als Risikogebiete klassifiziert waren, während die Standorte Rosenheim und Amberg in FSME-Risikogebieten liegen. Für Amberg wurde auf Grund einer Häufung schwerer Erkrankungen, die in drei von neun Fällen tödlich endeten, in den letzten Jahren ein steigendes Risiko vermutet (Böbenecker, 2007; Brey, 2007; K. Rausch, persönliche Mitteilung). Mit Passau wurde ein Standort in einem Landkreis gewählt, der als Hochrisikogebiet eingestuft war (Abb. 7).

Zu Beginn der Untersuchungen wurden an jedem Standort der Mittelpunkt der zu beprobenden Fläche festgelegt und für diesen Punkt die genauen Standortkoordinaten mittels GPS (*Global Positioning System*) ermittelt sowie die lokalen Gegebenheiten fotografisch festgehalten.

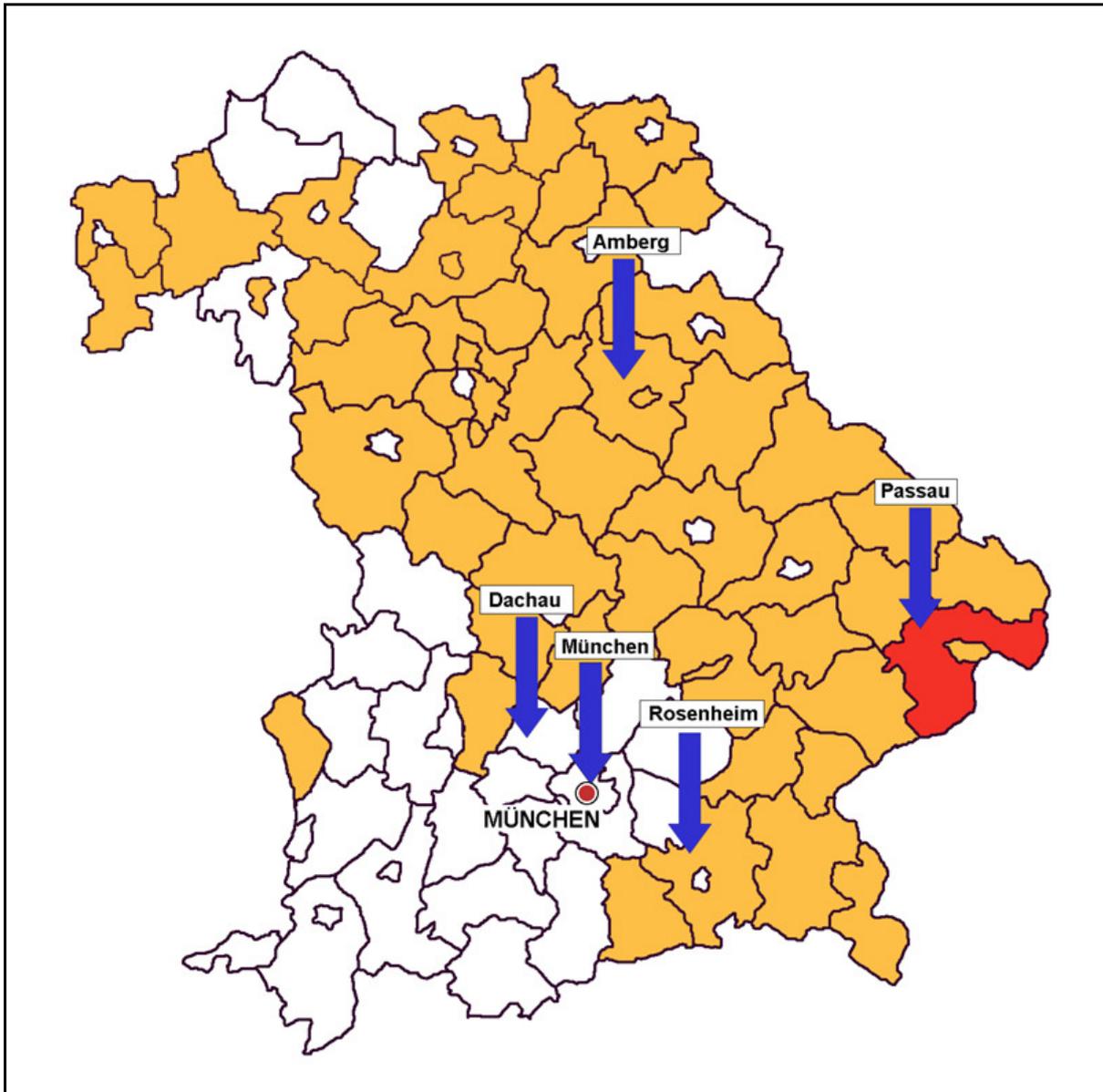


Abb. 7: Übersicht der untersuchten Standorte (blaue Pfeile) auf einer FSME-Risikogebietskarte Bayerns von 2006 (weiß: kein FSME-Risikogebiet, orange: FSME-Risikogebiet, rot: FSME-Hochrisikogebiet) (modifiziert nach RKI, 2006).

3.1.2 Charakteristika der Standorte

München

Der Standort „München“ (N 48°11'50.6" / E 11°37'56.5"; 493 m ü. NN) befindet sich am Nordende des Englischen Gartens. Dabei handelt es sich um eine Parkanlage, die von Anwohnern, insbesondere von Hundebesitzern, häufig genutzt wird. Die

beprobte Fläche ist eben und in Ufernähe eines Baches gelegen. In diesem Bereich stellen *Acer pseudoplatanus* (Berg-Ahorn), *Fraxinus excelsior* (Gemeine Esche) und *Tilia cordata* (Winter-Linde) die dominierenden Baumarten dar. Die Krautschicht wird vorrangig durch *Aegopodium podagraria* (Giersch) geprägt (Abb. 8 A, B).

Vorkommende Arten der Fauna sind hier *Oryctolagus cuniculus* (Wildkaninchen), *E. europaeus*, verschiedene Kleinsäuger, *Vulpes vulpes* (Fuchs) und *Corvus corone corone* (Rabenkrähe). Aufgrund der intensiven Nutzung durch Spaziergänger mit Hunden hält sich die früher häufige Art *C. capreolus* kaum noch in diesem Gebiet auf (H. Goldbrunner, persönliche Mitteilung).

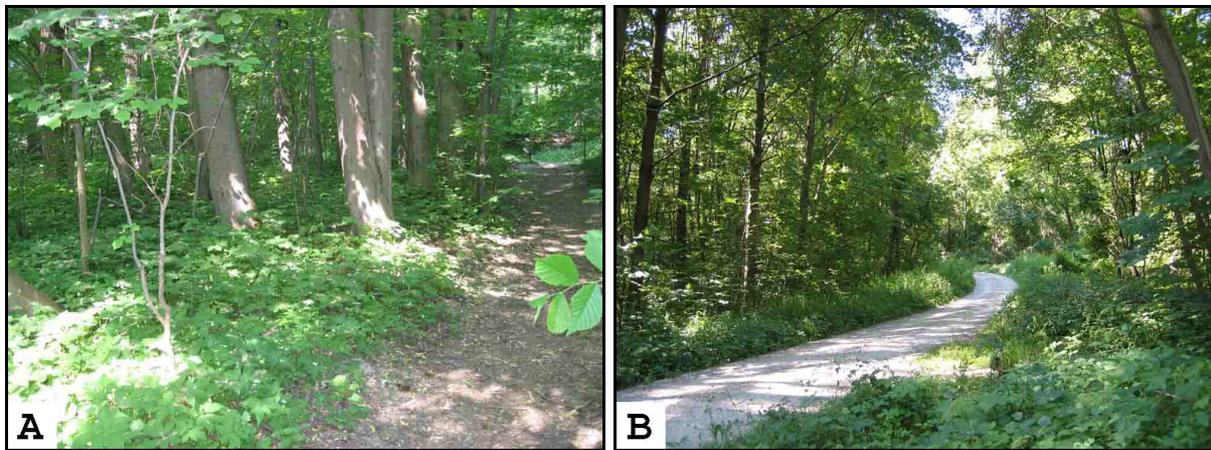


Abb. 8 A, B: Aufnahmen des Standortes München.

Dachau

Der Standort „Dachau“ (N 48°18'37.7" / E 11°15'15.5"; 526 m ü. NN) befindet sich in einem großen, vorwiegend mit Nadelbäumen bestandenen Wald, der forstwirtschaftlich genutzt wird. Die beprobte Fläche ist eben und wird in der Baumschicht neben *Picea abies* (Gemeine Fichte) auch durch alte *Quercus robur* (Stieleiche) geprägt sowie durch Jungdurchforstung mit *T. cordata*. In der Krautschicht dominiert *Carex sp.* (Segge) auf einer großen Fläche, in anderen Bereichen findet sich dichter Bewuchs mit *Rubus sp.* (Brombeere) neben teilweise bewuchslosem Laubboden (Abb. 9 A, B).

Die Fauna setzt sich aus *C. capreolus*, durchziehende Rotten von *S. scrofa*, *V. vulpes*, *L. europaeus*, *P. colchicus* und diversen Kleinsäugerarten zusammen,

wobei vermutlich auch *Martes martes* (Baummarder), *E. europaeus* und *Meles meles* (Dachs) vorkommen (A. Beer, persönliche Mitteilung).

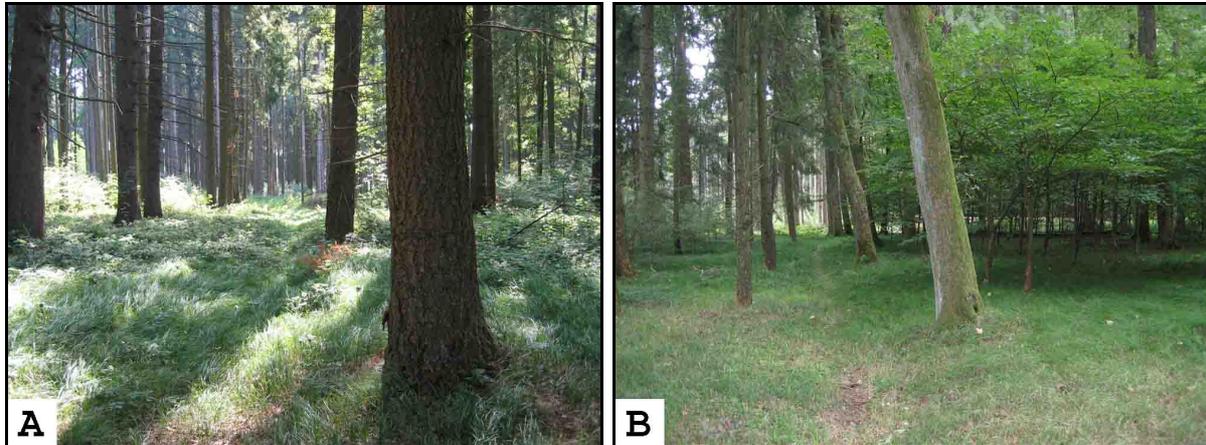


Abb. 9 A, B: Aufnahmen des Standortes Dachau.

Rosenheim

Der Standort „Rosenheim“ (N 47°54'27.9" / E 12°05'04.7"; 461 m ü. NN) ist in einem schmalen Waldstück, umgeben von landwirtschaftlich genutztem Gebiet, gelegen. Die besammelte Fläche grenzt an den Flusslauf der Rott und zeichnet sich durch entsprechende ufernahe Begleitvegetation aus: Die Krautschicht ist geprägt durch *Ranunculus sp.* (Hahnenfuss) und *Geum urbanum* (Echte Nelkenwurz). Auch wurden Anzeichen dafür entdeckt, dass diese Flächen zeitweise überflutet werden.

Angrenzend ist ein Bereich, in dem *P. abies* die vorherrschende Baumart darstellt, ergänzt durch *Populus nigra* (Schwarz-Pappel). Der Boden ist hier kaum bewachsen und mit Laub und Nadeln bedeckt. Ebenfalls besammelt wurde ein benachbarter, nach Süden ausgerichteter Hang, dessen üppige Krautschicht neben Gräsern durch Feuchteanzeiger wie z.B. *Equisetum sp.* (Schachtelhalm) und *Oxalis acetosella* (Waldsauerklee) sowie durch *Maianthemum bifolium* (Zweiblättrige Schattenblume) und *Impatiens parviflora* (kleinblütiges Springkraut) geprägt ist. Vorherrschende Baumarten sind hier *T. cordata* und *Q. robur* (Abb. 10 A, B).

Während der Sammeltermine wurden an diesem Standort *C. capreolus* sowie Hinweise auf das Vorkommen von *V. vulpes* beobachtet. Zudem sind Bodenlöcher vorhanden, die vermutlich von Wühlmäusen stammen.

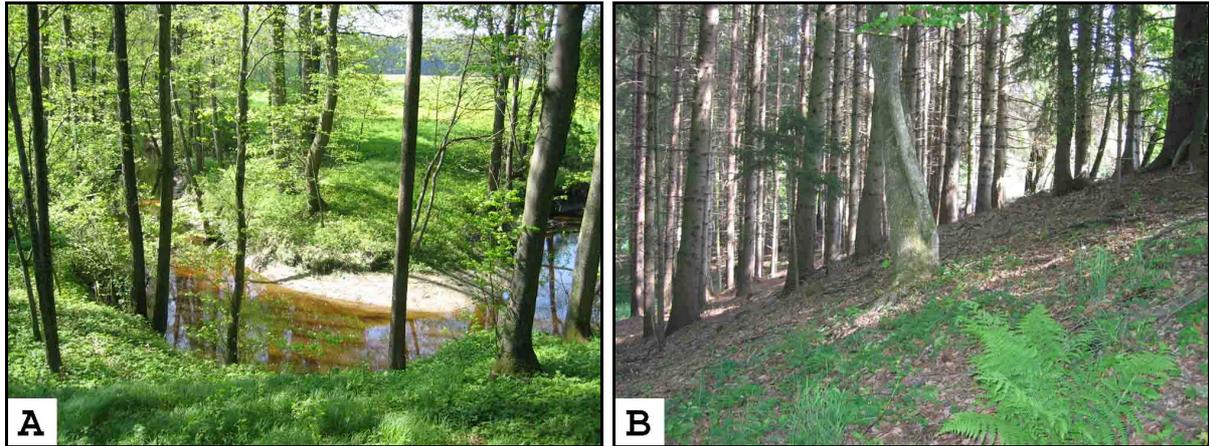


Abb. 10 A, B: Aufnahmen des Standortes Rosenheim.

Amberg

Der Standort „Amberg“ (N 49°28'49.3" / E 11°47'18.7"; 463 m ü. NN) liegt in einem ausgedehnten Mischwald, der von Wiesen durchzogen ist. Das gesamte beprobte Gebiet befindet sich in Hanglage mit feuchtem lehmigen Boden und weist eine üppige Krautschicht auf, deren Flora diese Charakteristika widerspiegelt: Sie ist geprägt durch *Ranunculus sp.* (Hahnenfuss), *Petasites albus* (Weiße Pestwurz), verschiedene Moose und Gräser, darunter *Juncus sp.* (Binse), sowie *Fragaria vesca* (Wald-Erdbeere). In der Baum- und Strauchschicht dominieren *Carpinus betulus* (Hainbuche), *Q. robur*, *P. abies*, und *Prunus spinosa* (Schwarzdorn) (Abb. 11 A, B).

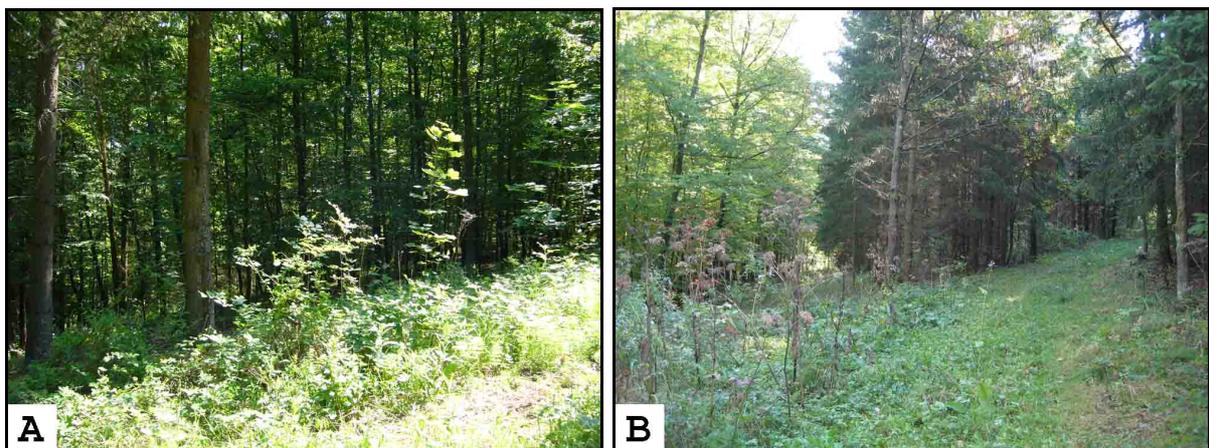


Abb. 11 A, B: Aufnahmen des Standortes Amberg.

An diesem Standort kommt *C. capreolus* vor, während *S. scrofa* nur gelegentlich als Wechselwild durchzieht. Neben *V. vulpes* sind *L. europaeus*, *M. foina* (Steinmarder), *M. meles*, *Mustela erminea* (Hermelin), *E. europaeus* und verschiedene Kleinsäugerarten vertreten. Auch streifen häufig Hauskatzen aus den umliegenden Wohngebieten durch den Wald (G. Ponkratz, persönliche Mitteilung).

Passau

Der Standort „Passau“ (N 48°40'14.5" / E 13°16'14.4"; 448 m ü. NN) liegt in einem kleinen Waldstück in Hanglage zwischen landwirtschaftlich genutzten Flächen und ist durch eine komplexe Struktur in verschiedenen Parzellen mit stark unterschiedlicher Flora charakterisiert. Die prägenden Pflanzen sind *Fagus sylvatica* (Rotbuche), *P. abies*, *Q. robur* und junge *Betula pendula* (Hängebirke) sowie *Vaccinium myrtillus* (Heidelbeere), *M. bifolium*, *Polygonatum odoratum* (Echtes Salomonssiegel), *Rubus* sp. und verschiedene Gräser. Dabei ist die Krautschicht in einigen Bereichen üppig ausgeprägt, in anderen Bereichen dagegen findet sich auf dem Boden eine dichte Laubschicht mit nur geringem Bewuchs (Abb. 12 A, B).

Die Fauna dieses Standortes setzt sich aus *C. capreolus*, durchziehenden Rotten von *S. scrofa*, *V. vulpes*, *L. europaeus*, *Martes* sp., *Sciurus vulgaris* (Europäisches Eichhörnchen) und Kleinsäugetern zusammen (J. Ragaller, persönliche Mitteilung).

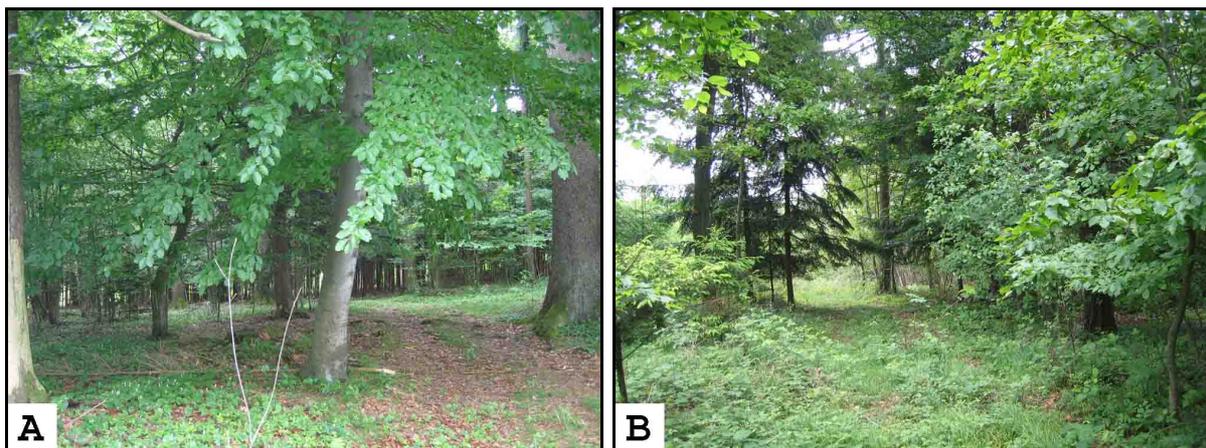


Abb. 12 A, B: Aufnahmen des Standortes Passau.

3.2 Sammeln der Zecken

Von April bis Dezember 2006 sowie von Februar bis Dezember 2007 wurden alle Standorte in jeweils monatlichem Abstand beprobt. Nüchterne, aktiv nach Wirten suchende Zecken wurden mit Zeckenfahnen von der Vegetation abgestreift (Sonenshine, 1993; Wilson, 1994). Hierzu wurden für jeden Standort separate, 1 m² große, weiße Baumwolltücher verwendet, die zwischen den Sammelterminen gegebenenfalls getrocknet und getrennt nach Standorten in verschlossenen Behältnissen gelagert wurden.

Als Bezugsgröße wurde eine Bodenfläche von 100 m² gewählt, die in einzelnen Zügen mit der Zeckenfahne von jeweils 2,5 m Länge besammelt wurde (Abb. 13 A). In der Regel wurde aber eine größere Fläche beprobt, und nachfolgend die Anzahl der gesammelten Zecken pro 100 m² berechnet (siehe Anhang 12.1, Tab. 17 bis Tab. 21). Dabei wurde eine repräsentative Probe jedes Standortes erhalten, indem möglichst alle Facetten des Sammelgebietes rund um den gewählten Mittelpunkt bei den Zügen berücksichtigt wurden. Hierzu zählte z.B. die Beprobung sowohl sonniger als auch schattiger Flächen sowie von Flächen mit unterschiedlichem Untergrundbewuchs. Um vergleichbare Bedingungen an den verschiedenen Terminen zu gewährleisten, wurde jeweils zu derselben Tageszeit und durch dieselbe Person oder Personengruppe gesammelt, jedoch nicht während oder direkt nach Regenfällen oder bei extremer Hitze.

Nach jedem Zug wurden die auf der Fahne vorhandenen Zecken mit Federstahlpinzetten abgesammelt. Direkt vor Ort fand die Aufteilung der Individuen nach Stadium und Geschlecht in Probengefäße (15 ml Zentrifugenröhrchen, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) statt, wobei einige Grashalme oder Blätter zu den Zecken gegeben wurden, um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit während der Aufbewahrung zu gewährleisten (Abb. 13 B). Die gesammelten Zecken wurden bis zur weiteren Aufbereitung maximal zehn Tage in einem haushaltsüblichen Kühlschrank bei etwa 7 °C zwischengelagert.



Abb. 13: A: Zeckensammeln mittels Zeckenfahne. B: Sortieren der Zecken nach Stadium und Geschlecht in Probengefäße.

3.3 Erfassen von Klima- und Wetterdaten

Während der Sammeltermine wurden jeweils die aktuellen Witterungsverhältnisse notiert, wobei eine Klassifizierung in sonnig / bewölkt / nebelig und trocken / feucht / nass / Schnee sowie windig / windstill gewählt wurde. Ebenfalls wurde die Temperatur im Schatten, in unmittelbarer Bodennähe, gemessen; ab Mai 2007 erfolgte zusätzlich die Messung der Luftfeuchtigkeit mittels eines digitalen Thermo-hygrometers (vgl. Anhang 12.1, Tab. 17 bis Tab. 21). Zudem wurden für die Jahre 2006 und 2007 jeweils von einer nahegelegenen Wetterstation des Deutschen Wetterdienstes Tageswerte für die Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Niederschlag angefordert. Eine Übersicht der Wetterstationen und ihrer jeweiligen Entfernung zum Standort zeigt Tab. 22, Anhang 12.1. Die erhaltenen Daten wurden im Hinblick auf eine Beziehung zu der jeweils festgestellten Aktivität der Zecken ausgewertet sowie zur Charakterisierung der an den Standorten herrschenden Bedingungen herangezogen.

3.4 Laboruntersuchungen

3.4.1 Vorbereiten der Zecken

Die gesammelten Nymphen und Adulten aus dem Jahr 2006 sowie die Zecken aller Stadien aus dem Jahr 2007 wurden anhand morphologischer Kriterien nach Hillyard (1996) und nach Snow (1978) unter einer Stereolupe bis zur Art bestimmt. Zecken, die bis zu diesem Zeitpunkt gestorben waren, wurden nicht weiter berücksichtigt und verworfen. Um äußerlich anhaftende Keime und Schmutz zu entfernen, wurden die Zecken zunächst für ca. fünf Minuten in 75%igem Ethanol (hergestellt aus Ethanol vergällt $\geq 99,8\%$, Roth, Karlsruhe) geschwenkt, gefolgt von einer kurzen Spülung durch Eintauchen in destilliertes Wasser und Trocknen auf saugfähigem Papier. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Extraktion der Gesamt-RNA

Die gefrorenen Zecken wurden mit $250\text{ }\mu\text{l}$ PBS-Puffer (Roti[®]-Stock 10 x PBS, Roth, Karlsruhe) sowie mit einer Stahlkugel von 3 mm (KGM Kugelfabrik Gebauer GmbH, Fulda) bei Nymphen bzw. 5 mm Durchmesser (Qiagen, Hilden) bei Adulten in sterile Probengefäße (2,0 ml Safe-Lock Tubes, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) gegeben und für fünf Minuten mit einer Frequenz von 30 s^{-1} durch Schütteln in einem TissueLyser (Qiagen, Hilden) homogenisiert. $30\text{ }\mu\text{l}$ dieses Homogenisates wurden mit $30\text{ }\mu\text{l}$ RNeasy[®] Lysis Solution (Qiagen, Hilden) versetzt und als Reserve für eventuell weitere notwendige Untersuchungen bei -20 °C gelagert, während $100\text{ }\mu\text{l}$ direkt für die Extraktion der Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Dies geschah nach der Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform Methode (Chomczynski und Sacchi, 1987) mittels TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Anweisung des Herstellers. Das resultierende RNA-Pellet wurde durch Zugabe von $30\text{ }\mu\text{l}$ RNeasy[™] Resuspension Solution (Qiagen, Hilden) und mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Flüssigkeit in Lösung gebracht. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 60 °C erfolgte die Lagerung der Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C . Die für die Homogenisierung eingesetzten Stahlkugeln wurden nach Reinigung in 5%iger Korsolex-Lösung

(Korsolex[®] extra, Bode Chemie, Hamburg) und anschließender Spülung mit Wasser autoklaviert, Heißluft-sterilisiert und bis zu einer erneuten Verwendung steril gelagert. Untersucht wurden mindestens je 300 Adulte und Nymphen eines Standortes. Eine Ausnahme bildet Rosenheim, wo zwar eine ausreichende Zahl Nymphen aber nur 235 adulte Zecken für die Untersuchungen zur Verfügung standen. Dabei wurden entsprechend der Vorgaben des EDEN-Projektes je Standort mindestens jeweils 100 Nymphen und Adulte als einzelne Zecken homogenisiert und 30 µl dieses Homogenisates als Reserve aufbewahrt. Anschließend wurden Homogenisate von je fünf Zecken zusammengefügt und aus den Pools die Gesamt-RNA extrahiert. Erwies sich ein solcher Pool im FSME-Nachweis als positiv, wurde RNA aus jeweils 15 µl der einzelnen Reserve-Homogenisate extrahiert und diese in den FSME-Nachweis eingesetzt. Auf Grund der sehr geringen Prävalenz des FSME-Virus wurden die weiteren Zecken direkt in Pools aus je fünf Zecken homogenisiert und weitergehend analysiert. Die Poolbildung erfolgte getrennt nach Stadium, Geschlecht, Standort und Sammeldatum. Die Anzahl der Zecken, die nach einzelner Homogenisierung oder direkt in Pools untersucht wurden, kann Tab. 23, Anhang 12.1 entnommen werden.

3.4.3 Untersuchungen mittels Polymerasekettenreaktion

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reaktionen, die auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) beruhen, wurde zunächst für mehrere Proben die Menge der einzelnen Komponenten berechnet und in einem 1,7 ml Reaktionsgefäß zu einem sogenannten Master-Mix zusammengefügt, der anschließend auf die einzelnen Reaktionsgefäße aufgeteilt wurde.

Für die Herstellung der Reaktionsansätze wurde SuperScript[™] III RT / Platinum[®] One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, welches die Enzyme Reverse Transkriptase und eine Polymerase enthält und so die Synthese der komplementären DNA und die folgende PCR-Reaktion in einem Ansatz ermöglicht. Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma MWG Biotech AG, Ebersberg, synthetisiert.

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten Sonden handelt es sich um TaqMan-Sonden. Diese bestehen aus einem zu der Zielsequenz komplementären Oligonukleotid, an dessen 5'-Ende sich ein Donor-Fluorochrom befindet. Nach Anregung durch eine

Lichtquelle überträgt das Donor-Molekül Energie auf ein Akzeptor-Molekül (Quencher), welches sich am 3'-Ende befindet. Während der DNA-Synthese hybridisiert die Sonde mit der DNA und wird durch Exonuclease-Aktivität der Polymerase gespalten, so dass sich Donor und Akzeptor voneinander entfernen und die Energie des Donor-Moleküls in Form von Fluoreszenz messbar wird (Holland *et al.*, 1991; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Die eingesetzten Sonden wiesen jeweils als Donor-Molekül FAM (TBE-Sonde) oder HEX (16S-Sonde) auf; TAMRA diente bei den durchgeführten real-time PCRs als Quencher.

Alle hier beschriebenen Untersuchungen mittels real-time PCR wurden in einem real-time Cycler (Mx3000P™ Real-Time PCR System, Stratagene, USA) durchgeführt. Eine Reaktion wurde als positiv gewertet, wenn ihre Fluoreszenzkurve einen sigmoiden Verlauf zeigt und einen Schwellenwert überschreitet (Abb. 14).

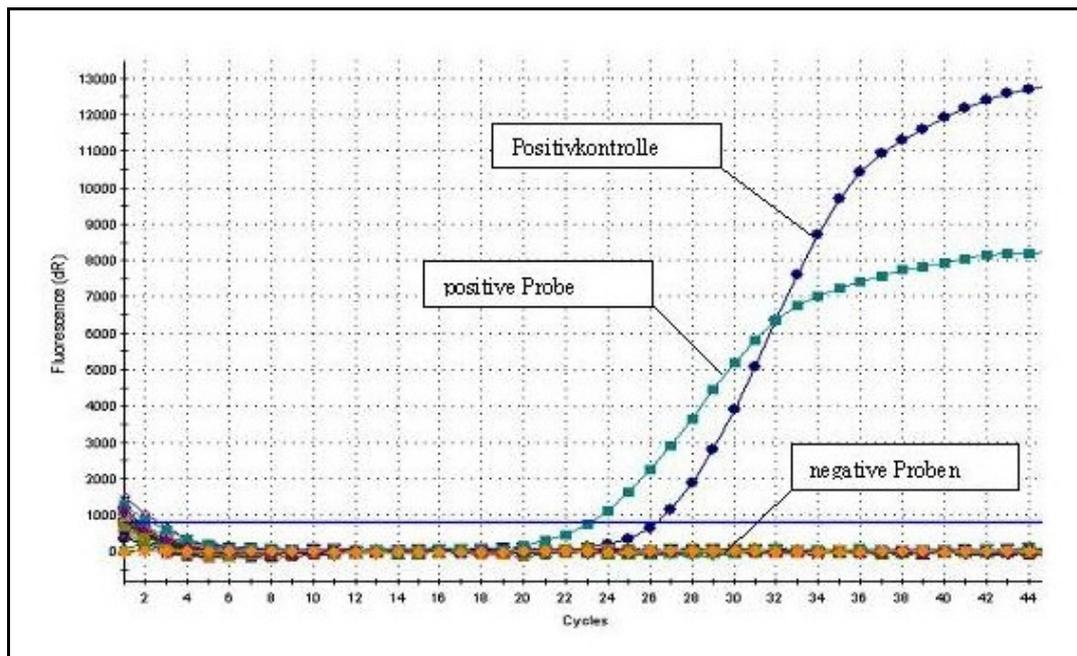


Abb. 14: Beispielhafte Darstellung eines real-time PCR-Ergebnisses (x-Achse: Anzahl der Reaktions-Zyklen; y-Achse: Fluoreszenz-Intensität; horizontale blaue Linie: Schwellenwert).

3.4.4 Nachweis des FSME-Virus-Genoms

Extrahierte RNA wurde mittels real-time RT-PCR (real-time Reverse Transkriptase-PCR) auf Vorkommen des FSME-Virus getestet, wobei eine 68 bp große Zielsequenz in der 3'-NCR der Virus-RNA amplifiziert wurde. Die Sequenzen der Primer F-TBE 1 und R-TBE 1 sowie der Sonde (TBE-Sonde) wurden einer Publikation von Schwaiger und Cassinotti (2003) entnommen und die dort angegebenen Reaktionsbedingungen leicht modifiziert (Tab. 5, Tab. 6). Das Temperaturprofil sowie die Anzahl der Zyklen entsprechen den in Tab. 7 genannten Bedingungen. In jedem PCR-Lauf wurden als Positivkontrolle 3 µl RNA des FSME-Stammes Ljubljana II integriert, die von Prof. Avšič-Županc, Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, Ljubljana, Slowenien, zur Verfügung gestellt wurde. Als Negativkontrolle dienten 5 µl destilliertes Wasser (Ultrapure DNase-/RNase-Free distilled water, Invitrogen, Karlsruhe).

Tab. 5: Primer und Sonde für den FSME-Nachweis durch Amplifikation von Virus-RNA der 3'-NCR (nach Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge (nt)
F-TBE 1	GGGCGGTTCTTGTTCTCC	18
R-TBE 1	ACACATCACCTCCTTGTCAGACT	23
TBE-Sonde	TGAGCCACCATCACCCAGACACA	23

Tab. 6: Reaktionsansatz für den FSME-Nachweis durch Amplifikation von Virus-RNA der 3'-NCR (nach Schwaiger und Cassinotti, 2003, modifiziert).

Reagenz	Volumen (µl)
Aqua dest.	5,85
2X Reaction Mix	12,50
Primer F-TBE1 (100 µM)	0,75
Primer R-TBE1 (50 µM)	0,15
TBE-Sonde (20 µM)	0,25
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix	0,50
RNA	5,00
Gesamtvolumen	25,00

Tab. 7: RT-PCR-Protokoll für den FSME-Nachweis durch Amplifikation von Virus-RNA der 3'-NCR (nach Schwaiger und Cassinotti, 2003, modifiziert).

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	42 °C	30 min	1x
Aktivierung Polymerase	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	} 45x
Annealing / Elongation	60 °C	1 min	

3.4.5 Nachweis der 16S rRNA von *I. ricinus*

Zehn Prozent aller im FSME-Nachweis untersuchten Proben wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und mittels real-time RT-PCR auf das Vorhandensein von 16S rRNA von *I. ricinus* getestet. Diese Reaktion diente zum Abschätzen des Anteils falsch negativer Ergebnisse im FSME-Nachweis durch fehlerhafte RNA-Extraktion oder durch RT-PCR-Inhibitoren. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sowie die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes entstammen einer Publikation von Schwaiger und Cassinotti (2003) (Tab. 8, Tab. 9). Die Reaktionsbedingungen entsprechen den in Tab. 7 genannten Bedingungen.

Dabei wurde zunächst die extrahierte RNA direkt in die real-time RT-PCR eingesetzt. In einer weiteren PCR wurden Aliquots derselben RNAs mit DNase I, Amplification Grade (Invitrogen, Karlsruhe) entsprechend der Anleitung des Herstellers inkubiert und dann erneut unter denselben PCR-Bedingungen auf 16S rRNA von *I. ricinus* getestet, um falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation von in der Probe vorhandenen 16S rDNA-Anteilen auszuschließen. Als Negativkontrolle wurden bei jeder dieser Reaktionen 5 µl destilliertes Wasser (Ultrapure DNase-/ RNase-Free distilled water, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

Tab. 8: Primer und Sonde für den Nachweis der 16S rRNA von *Ixodes ricinus* (nach Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge (nt)
F-16S	AAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAA	29
R-16S	ACCAAAAAGAATCCTAATCCAACA	25
16S-Sonde	TTTTGGATAGTTCATATAGATAAAATAGTTTGCGACCTCG	40

Tab. 9: Reaktionsansatz für den Nachweis der 16S rRNA von *Ixodes ricinus* (nach Schwaiger und Cassinotti, 2003, modifiziert).

Reagenz	Volumen (µl)
Aqua dest.	5,75
2X Reaction Mix	12,50
Primer F-16S (10 µM)	0,50
Primer R-16S (10 µM)	0,50
16S-Sonde (10 µM)	0,25
SuperScript TM III RT / Platinum [®] Taq Mix	0,50
RNA	5,00
Gesamtvolumen	25,00

3.4.6 PCR-Amplifikation und Sequenzierung des viralen E-Gens

Bei allen Proben, in denen FSME-RNA mittels real-time RT-PCR der 3'-NCR nachgewiesen werden konnte, wurde ein 1588 bp großes Fragment der Region des E-Gens in einer konventionellen RT-PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Dieser Teil der Arbeit wurde am Mikrobiologischen Institut der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München, durchgeführt.

Die Primer, der Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen für die initiale Amplifizierung sind in Tab. 10, Tab. 11 und Tab. 12 dargestellt. Jeweils 3 µl des PCR-Produktes wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, das Gel nachfolgend mittels GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain 10000x (Biotium, USA) entsprechend der Anweisung des Herstellers gefärbt und unter UV-Licht betrachtet. So wurde der Erfolg der Amplifikation und die Größe des PCR-Produktes überprüft. Erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte wurden entsprechend der Herstellerangaben mit dem QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Anschließend wurden die PCR-Produkte durch Cycle Sequencing nach Angaben des Herstellers mittels BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems, USA, für die folgende Sequenzierung farblich markiert. Überschüssige Chemikalien wurden mittels Centri-Sep Columns (Princeton Separations, USA) von den PCR-Produkten getrennt, die dann mit Formamid (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, USA) versetzt und in dem Gerät ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens sequenziert wurden (ursprünglich beschrieben durch Sanger *et al.*, 1977).

Tab. 10: Primer für die Amplifikation des E-Gens (Quelle: M. Pfeffer, persönliche Mitteilung).

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge (nt)
TBE-EF10	ACACACTTGGAAAACAGGG	19
TBE-NS1R109	CCGGGTAGTAGGCATAATTG	20

Tab. 11: Reaktionsansatz für die Amplifikation des E-Gens.

Reagenz	Volumen (µl)
Aqua dest.	16
2X Reaction Mix	25
TBE-EF1 (10 µM)	1
TBE-NS1R109 (10 µM)	1
SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix	2
RNA	5
Gesamtvolumen	50

Tab. 12: RT-PCR-Protokoll für die Amplifikation des E-Gens.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
Reverse Transkription	50 °C	45 min	1x
Denaturierung	94 °C	5 min	1x
Denaturierung	94 °C	30 s	} 40x
Annealing	53 °C	30 s	
Elongation	68 °C	2 min	
Halten	68 °C	10 min	1x

Nach Überprüfen der erhaltenen Chromatogramme mit Hilfe des Programms Chromas® Lite (www.technelysium.com.au/chromas_lite.html, 07.04.2008) wurden die jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtssequenzen mit der Funktion „Sequence Assembly“ des Computerprogramms DNAMAN (Version 5.2.9, Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada) zusammengefügt. Die Nukleotide 54 bis 1488 des E-Gens wurden im Folgenden mittels „Multiple Sequence Alignment“ unter Verwendung von Clustal W (Feng und Doolittle, 1987; Thompson *et al.*, 1994) miteinander verglichen, wobei die Nukleotid-Positionen entsprechend der Sequenz des Stammes Neudoerfl (Genbanknummer: M27157) gezählt wurden. Hierzu wurde als Methode „Full Alignment“ gewählt und ein „Dynamic Alignment“ mit den Parametern „Gap open

penalty“ von 10, „Gap extension penalty“ von 5 und „Delay divergent sequences“ von 30 % durchgeführt.

3.4.7 Phylogenetische Analysen

Als Vergleichssequenzen für das Erstellen der Phylogenie wurden bereits veröffentlichte Sequenzen der verschiedenen FSME-Subtypen und nahe verwandter Viren aus der Genbank unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> (27.04.2008) ausgewählt (Tab. 24, Anhang 12.3).

Phylogenetische Beziehungen und deren Darstellung in phylogenetischen Stammbäumen wurden mittels „Distance-Matrix“- , „Maximum-Parsimony“- und „Maximum-Likelihood“- Analysen der Nukleinsäure-Alignments mit dem Programm PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Felsenstein, 2005; Version 3.6, Seattle, USA) erstellt. Für „Distance-Matrix“-Analysen wurde ein „neighbor joining“-Stammbaum mit der Option F84 unter Verwendung der Algorithmen DNADIST und NEIGHBOR erstellt. Für „Maximum-Parsimony“-Analysen wurde der Algorithmus DNAPARS verwendet. Die Signifikanz einzelner Aufspaltungen in der phylogenetischen Darstellung wurde mittels „bootstrapping“ über 1000 Replikate für „Distance-Matrix“-Analysen und „Maximum-Parsimony“-Analysen mit den Programmen SEQBOOT und CONSENSE ermittelt. „Maximum-Likelihood“-Analysen erfolgten mit dem Programm DNAML. „Bootstrapping“ wurde hier nicht durchgeführt, da es sich bei dieser Methode selbst um eine statistische Anwendung handelt. Zur Erstellung der phylogenetischen Stammbäume wurden die Programme RETREE und DRAWGRAM verwendet.

3.5 Statistik

Auf eine mögliche Beziehung zwischen der Anzahl gesammelter Larven, Nymphen und adulter Zecken und den während der Sammlungen gemessenen Temperaturen wurde mittels Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Nach demselben Verfahren wurde eine mögliche Korrelation der Anzahl gesammelter Zecken mit den Werten für die relative Luftfeuchtigkeit geprüft. Hierzu wurde das Programm R, Version 2.7.1 (www.r-project.org, 29.07.2008), verwendet. Zusätzlich wurden die

erhaltenen Daten mittels linearer Regression analysiert, die beobachtete Beziehung in einer Funktion ausgedrückt sowie das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet.

Die Prävalenzen der FSME-infizierten Zecken in der jeweiligen Gesamtpopulation wurden für gepoolte Proben nach Abel *et al.* (1999) mit der folgenden Formel geschätzt:

$$P = 1 - (1 - X_p / n_p)^{1/c}$$

P: geschätzte Prävalenz; X_p : Anzahl positiver Pools; n_p : Anzahl getesteter Pools; c: Poolgröße

Die entsprechenden 95 %-Konfidenzintervalle wurden mit Hilfe der Pearson-Clopper-Werte berechnet. Die Pearson-Clopper-Werte finden Anwendung bei kleinen Anzahlen n und kleinen Werten für die Prävalenz p , bei denen $np(1-p) \geq 9$ nicht erfüllt und somit eine Approximation durch die Binomial- oder Normalverteilung nicht möglich ist (Hartung *et al.*, 1987).

Die minimale Infektionsrate (MIR) entspricht der Annahme, dass jeweils maximal eine FSME-positive Zecke in einer gepoolten Probe enthalten ist. Diese Werte sowie ihre 95 %-Konfidenzintervalle wurden ebenfalls mit Hilfe der Pearson-Clopper-Werte berechnet und als Vergleichswerte angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Anzahl und saisonale Aktivität der Zecken

Von April 2006 bis Dezember 2007 wurden an den fünf gewählten Standorten insgesamt 12068 aktiv nach Wirten suchende Zecken (2458 Adulte, 5391 Nymphen, 4219 Larven) gesammelt. Betrachtet man für jeden Standort eine Bezugsfläche von 100 m² so entspricht dies einer Summe von 4301 an allen Terminen gesammelten Zecken (289 Adulte, 1526 Nymphen, 2486 Larven). Die tatsächlich beprobten Flächen je Termin sind in Tab. 17 bis Tab. 21 im Anhang 12.1 angegeben. Dabei handelte es sich ausschließlich um Zecken der Art *I. ricinus*. Zwischen den Standorten zeigten sich Unterschiede sowohl in den Anteilen der verschiedenen Stadien an der Gesamtzahl als auch in der Zeckenanzahl pro 100 m² (Abb. 15). So lag der Anteil der Larven an den Standorten München und Dachau bei 13,5 % bzw. 14 %, während er an den anderen Standorten zwischen 59,4 % und 70,7 % variierte. Erstere waren auch die Standorte, an denen insgesamt die geringste Zeckenanzahl gesammelt wurde, wohingegen am Standort Passau die größte Anzahl festgestellt wurde.

Da im Jahr 2006 noch im März eine geschlossene Schneedecke vorhanden war, fanden die ersten Sammlungen im April statt und zeigten zu dieser Zeit bereits aktive Zecken. Im Jahr 2007 hingegen wurde bei günstigen Witterungsverhältnissen bereits im Februar gesammelt und eine in Februar oder März einsetzende Aktivität beobachtet. Die Aktivität der Larven setzte jeweils sprunghaft ein, während zuvor bereits Nymphen und Adulte aktiv waren. In beiden Sammeljahren wurden bis in den Oktober aktive Zecken aller Stadien festgestellt. Dabei wurden in 2006 einzelne Nymphen und Adulte auch noch im November und Dezember gefunden, während in 2007 ab November an den untersuchten Standorten keine Zeckenaktivität feststellbar war. Das Ende der Aktivität der Larven im Jahr 2006 lag in allen Fällen im Oktober, während Nymphen an vier von fünf Standorten noch im November gesammelt wurden, Adulte an jeweils einem Standort im November und Dezember. An den beprobten Orten wurde die höchste Zeckenaktivität, gemessen an der Anzahl der auf der Zeckenfahne befindlichen Zecken pro 100 m² untersuchter Bodenfläche, in der Regel in den Monaten Mai und Juni festgestellt (Abb. 16). Nach einer

verringerten Aktivität während der Sommermonate wurden erneute Aktivitätsmaxima im Herbst nicht oder nur in sehr geringer Ausprägung beobachtet. Aktivitätsmaxima der Larven und Nymphen wurden jeweils zeitgleich beobachtet, wobei in Rosenheim der Beginn der Aktivität im Jahr 2006 möglicherweise nicht erfasst wurde. In München und Dachau wurden zwar Larven gefunden, ihre Zahl war aber sehr gering, so dass der Zeitpunkt eines Aktivitätsmaximums nicht festgelegt werden konnte.

Im Vergleich zwischen 2006 und 2007 lag die im zweiten Jahr gesammelte Zahl der juvenilen Stadien, insbesondere der Nymphen, pro 100 m² je Sammeltermin generell höher, die Anzahl der adulten Zecken war in beiden Jahren ähnlich hoch. Eine Ausnahme stellt dabei der Standort München dar, mit leicht geringeren Zeckenzahlen im Jahr 2007; maximale Werte für Larven, Nymphen und Adulte betragen hier 74 %, 67 % bzw. 86 % der Vorjahreswerte. In Amberg wurde in 2007 nur etwa ein Drittel der in 2006 maximal beobachteten Larvenanzahl gesammelt, der Maximalwert der Nymphen betrug hier allerdings fast das Dreifache des Vorjahreswertes. Auch am Standort Dachau wurden in 2007 knapp geringere Maximalwerte für Larven (94 % des Vorjahres) festgestellt, mit 188 % aber deutlich mehr Nymphen. In Passau lag die Zahl der maximal aktiven Nymphen pro 100 m² je Sammeltermin in 2007 zwar ebenfalls knapp unter der des Vorjahres, allerdings waren die Nymphen über einen deutlich längeren Zeitraum von März bis Juni in großer Zahl aktiv.

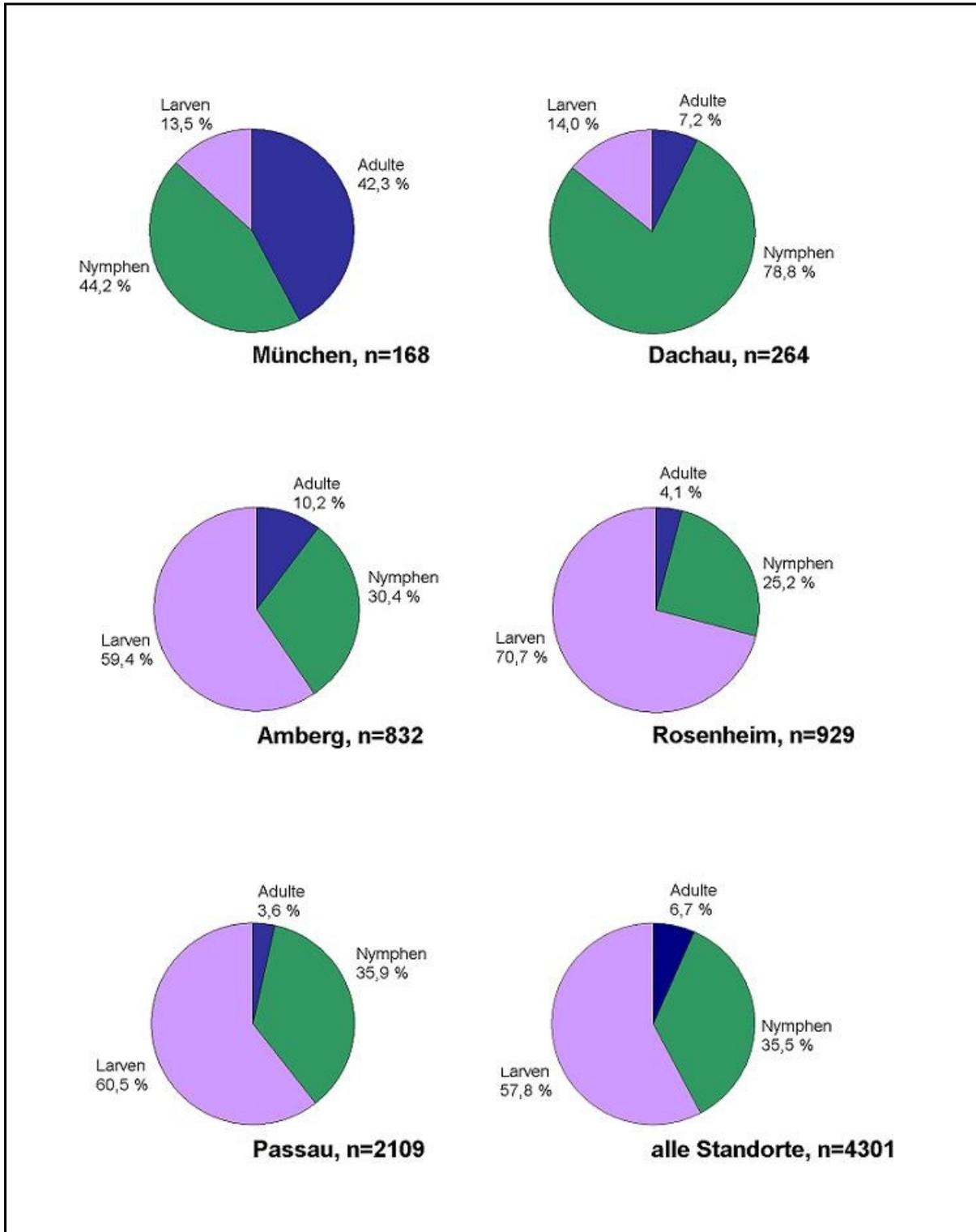


Abb. 15: Verteilung der gesammelten Zecken auf die verschiedenen Stadien nach Standorten. n wurde als Summe der pro 100 m² während aller Sammeltermine in den Jahren 2006 und 2007 gesammelten Individuen berechnet (tatsächlich wurden auf einem Vielfachen der Fläche größere Individuenzahlen gesammelt).

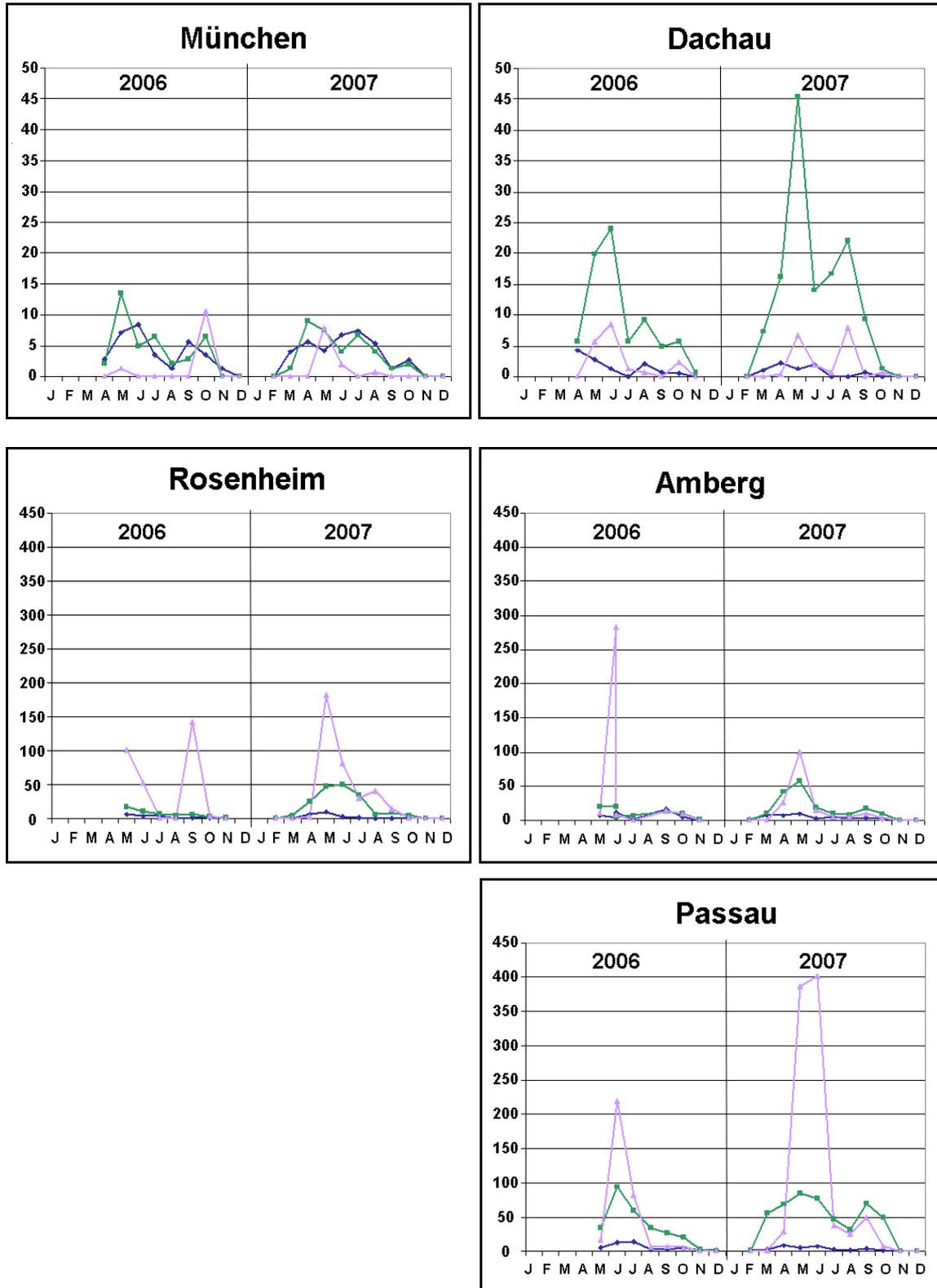


Abb. 16: Anzahl gesammelter Zecken pro Sammeltermin. x-Achse: Monate in den Jahren 2006 und 2007, y-Achse: Anzahl gesammelter Zecken pro 100 m², lila Kurve: Larven, grüne Kurve: Nymphen, blaue Kurve: Adulte.

4.2 Wetterdaten

Die Korrelationsanalyse nach Spearman der während der Sammlungen vor Ort gemessenen Temperaturwerte und der jeweils gesammelten Anzahl an Zecken zeigte eine schwach positive Beziehung, wobei der Korrelationskoeffizient r Werte bis zu 0,78 annahm. Die ebenfalls nach Spearman durchgeführte Korrelationsanalyse der gemessenen Werte der relativen Luftfeuchtigkeit und der Anzahl gesammelter Zecken ergab dagegen eine negative Beziehung mit Werten von r zwischen -0,18 und -0,91. Die hier verwendeten, während der Sammeltermine gemessenen Daten für Temperatur und Luftfeuchtigkeit sind im Anhang unter 12.1, Tab. 17 bis Tab. 21 aufgeführt. Die berechneten Werte für r zeigt Tab. 13.

Tab. 13: Korrelation zwischen der Anzahl gesammelter Zecken mit der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit. Angegeben sind Werte für den Korrelationskoeffizienten r nach Spearman.

Standort	Korrelationsanalyse der Temperatur ^a und Zeckenanzahl			Korrelationsanalyse der relativen Luftfeuchtigkeit ^a und Zeckenanzahl		
	Larven	Nymphen	Adulte	Larven	Nymphen	Adulte
München	$r = 0,38$ (20 ^b)	$r = 0,66$ (20)	$r = 0,72$ (20)	$r = -0,30$ (8)	$r = -0,41$ (8)	$r = -0,18$ (8)
Dachau	$r = 0,53$ (19)	$r = 0,60$ (19)	$r = 0,19$ (19)	$r = -0,24$ (8)	$r = -0,51$ (8)	$r = -0,80$ (8)
Rosenheim	$r = 0,77$ (17)	$r = 0,78$ (17)	$r = 0,47$ (17)	$r = -0,91$ (8)	$r = -0,88$ (8)	$r = -0,68$ (8)
Amberg	$r = 0,48$ (18)	$r = 0,45$ (18)	$r = 0,58$ (18)	$r = -0,59$ (8)	$r = -0,63$ (8)	$r = -0,41$ (8)
Passau	$r = 0,60$ (19)	$r = 0,41$ (19)	$r = 0,47$ (19)	$r = -0,79$ (8)	$r = -0,71$ (8)	$r = -0,79$ (8)

^a verwendet wurden die an den Sammelterminen vor Ort gemessenen Werte

^b jeweils in Klammern angegeben ist n : Anzahl der für die Berechnung verwendeten Datenpunkte

Die Untersuchung der oben genannten Daten mittels linearer Regression ergab ebenfalls eine positive Beziehung zwischen der Anzahl gesammelter Zecken und der vor Ort gemessenen Temperatur, wobei das Bestimmtheitsmaß R^2 Werte von 0,02 bis 0,55 annahm. Dagegen zeigten die Regressionsanalysen der Anzahl gesammelter Zecken und der vor Ort gemessenen relativen Luftfeuchtigkeit jeweils eine negative Beziehung mit Werten für R^2 von 0,01 bis 0,98. Die Ergebnisse der

Regressionsanalysen sind im Anhang 12.2, Abb. 24 A - F und Abb. 25 A - F graphisch dargestellt.

Den Temperaturverlauf im wöchentlichen Durchschnitt der Jahre 2006 und 2007, gemessen durch die entsprechenden Wetterstationen, zeigt Abb. 17. Im Januar 2006 wurden bei minimalen Tagesdurchschnittstemperaturen von -14 °C deutlich niedrigere Temperaturen gemessen als im darauf folgenden Winter, der mit minimalen Tagesdurchschnittstemperaturen von -8 °C insgesamt als milder zu bezeichnen war. Visuell waren keine deutlichen Unterschiede in der Dauer und Amplitude des Temperaturabfalls im Herbst zwischen den Standorten erkennbar. Im Vergleich zwischen den Wetterstationen verzeichnete die im Landkreis Passau gelegene Station, insbesondere während der Wintermonate, die tiefsten Temperaturen (die Differenz zu den anderen Stationen betrug bis zu $6,6\text{ °C}$). Die Messungen der Wetterstation in München ergaben dagegen durchschnittlich $1,0\text{ °C}$ bis $1,8\text{ °C}$ höhere Werte als diejenigen der übrigen Stationen. Die vergleichsweise höheren Temperaturen der Station in München und die durch die Station im Landkreis Passau gemessenen tieferen Temperaturen werden auch in Abb. 18 deutlich, in der die Anzahl von Tagen in einem bestimmten Temperaturbereich (Intervalle von je 5 °C) dargestellt ist. Der jährliche Gesamtniederschlag lag an allen Standorten bei über 7000 mm , wobei die in 2007 gemessenen Mengen größer waren als in 2006. Am Standort Passau wurde im Standortvergleich die größte Menge verzeichnet (Abb. 19). Abgesehen von den genannten Temperaturunterschieden konnten anhand der in Abb. 17 bis Abb. 19 dargestellten Daten der Wetterstationen keine deutlichen Abweichungen der Standortfaktoren zwischen den untersuchten Gebieten festgestellt werden.

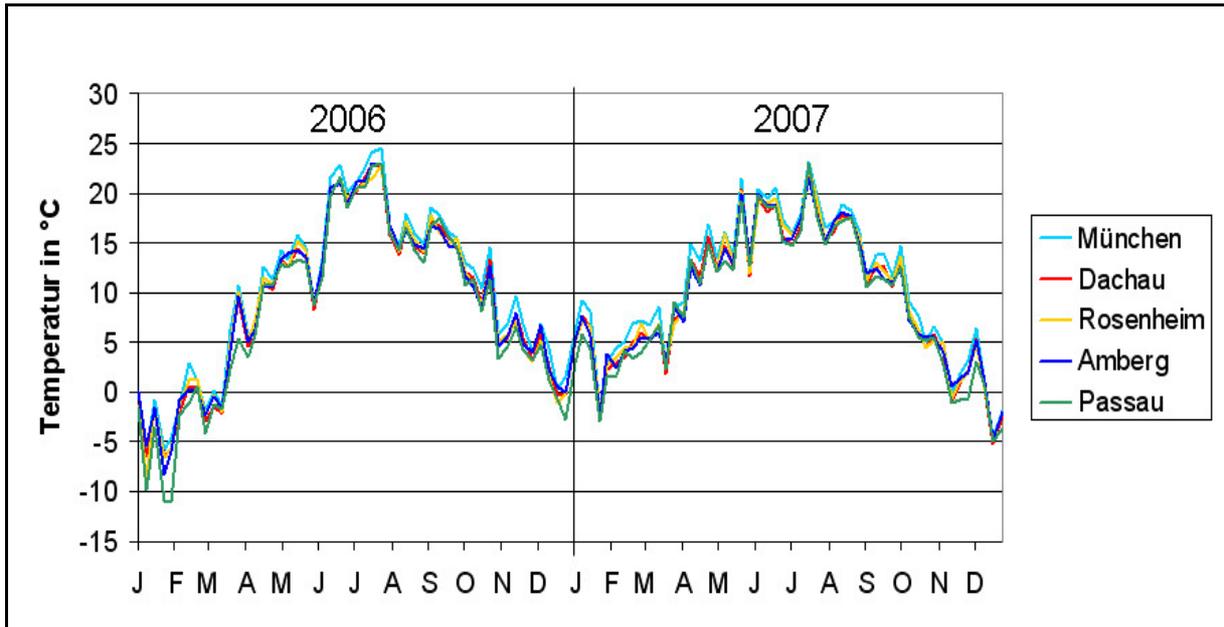


Abb. 17: Temperaturverlauf in den Jahren 2006 und 2007 an den verschiedenen Standorten, erstellt auf Basis der wöchentlichen Durchschnittstemperaturen.

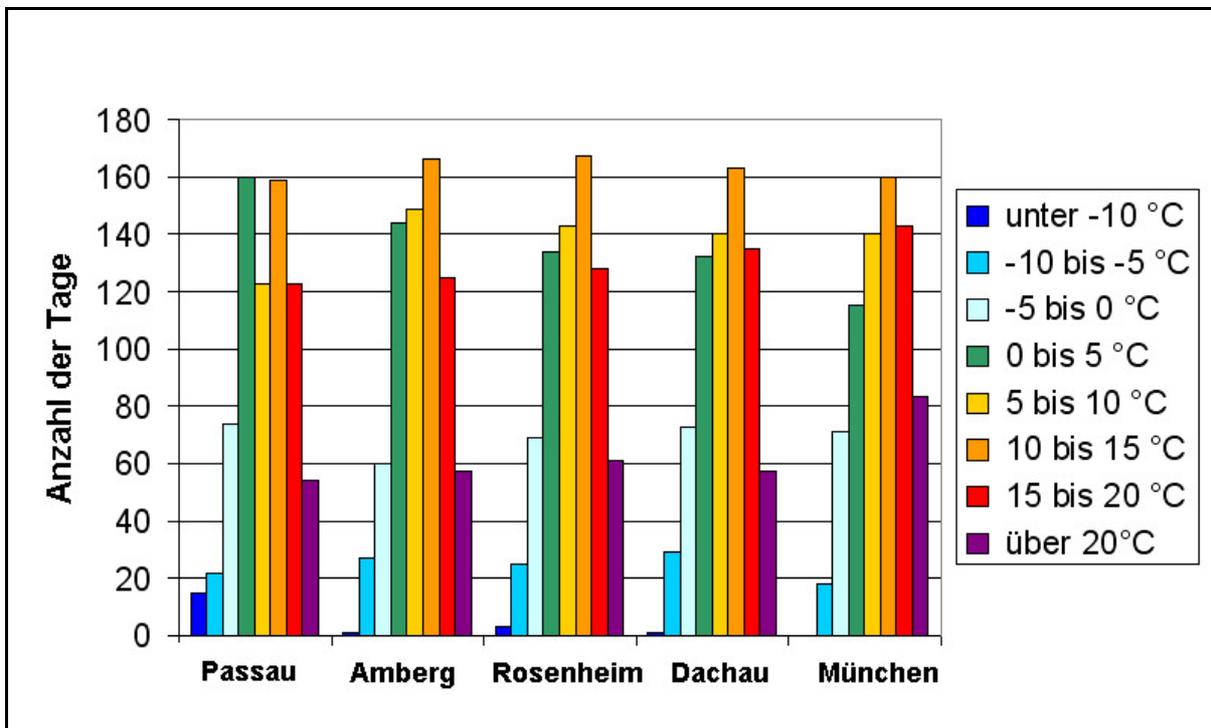


Abb. 18: Variation der Tagesdurchschnittstemperatur an den Wetterstationen in den Jahren 2006 und 2007, dargestellt als Anzahl der Tage in Temperaturintervallen von 5 °C.

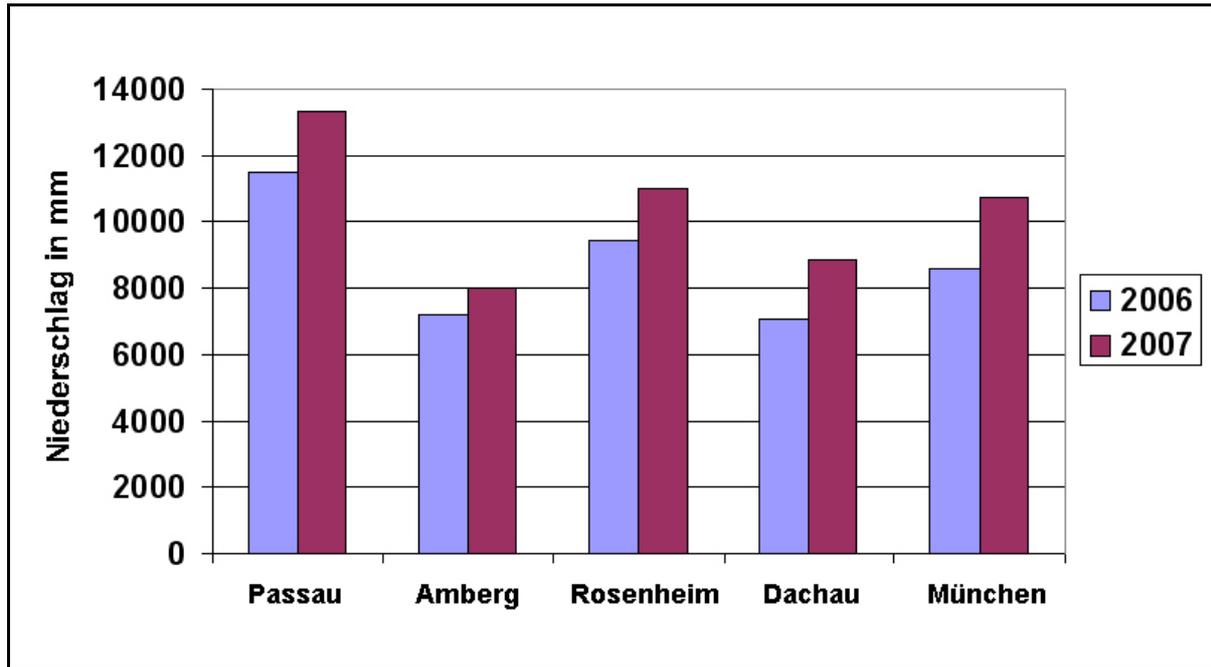


Abb. 19: Jährliche Niederschlagshöhe an den verschiedenen Standorten in den Jahren 2006 und 2007.

4.3 Vorkommen des FSME-Virus in den Zecken

1965 Nymphen und 1325 adulte Zecken aus dem Sammeljahr 2006 sowie 140 Adulte aus dem Sammeljahr 2007, die aufgrund einer zum Teil geringen Anzahl adulter Zecken in 2006 ergänzt wurden, wurden mittels real-time RT-PCR der 3'-NCR auf das Vorkommen des FSME-Virus getestet. Insgesamt wurde in 15 Zecken oder Zeckenpools RNA des FSME-Virus nachgewiesen. Dabei waren bei allen PCR-Untersuchungen auf RNA des FSME-Virus die jeweils mitgeführten Negativkontrollen negativ, die Positivkontrollen zeigten in allen Fällen ein positives Ergebnis.

Fünf der positiven Ansätze waren RNA-Pools, die nach vorhergehender einzelner Homogenisierung der Zecken entstanden waren. Durch erneute RNA-Isolation aus Reserve-Homogenisaten der einzelnen Zecken wurde festgestellt, dass jeweils nur eine der fünf Zecken des Pools mit dem Virus infiziert war.

Schätzungen der Virus-Prävalenz in Nymphen und Adulten aller Standorte für gepoolte Proben nach Abel *et al.* (1999) ergaben einen Mittelwert von 0,44 %, wobei die Werte für die einzelnen Standorte 0 % in Dachau und München, 0,18 % in Rosenheim, 0,31 % in Amberg und 1,34 % in Passau betragen. Die Prävalenz des

Virus in den untersuchten Nymphen variierte zwischen 0 % und 1,34 % (Mittelwert 0,46 %), während diejenige der adulten Weibchen zwischen 0 % und 1,21 % (Mittelwert 0,54 %), diejenige der adulten Männchen zwischen 0 % und 1,53 % (Mittelwert 0,28 %) variierte. Dabei lag die Virus-Prävalenz aller untersuchten adulten Zecken bei 0,41 %. Die ermittelten Prävalenzwerte für gepoolte Proben sowie die minimalen Infektionsraten (MIR, vgl. Kapitel 3.5) und die jeweiligen 95 %-Konfidenzintervalle können Tab. 14 entnommen werden.

Tab. 14: Übersicht der ermittelten FSME-Prävalenzen nach Standorten und Zeckenstadien. Gegenüberstellung der Prävalenz für gepoolte Proben und der minimalen Infektionsrate (MIR) mit Angabe der 95%-Konfidenzintervalle. N: Nymphen, A: Adulte, w: weiblich, m: männlich.

Standort	Stadium	Anzahl untersuchter Zecken (Anzahl positiver Zecken)	gepoolte Proben Prävalenz [Konfidenzintervall] in %	MIR Prävalenz [Konfidenzintervall] in %
Passau	N	615 (8)	1,34 [0,59 ; 2,53]	1,30 [0,56 ; 2,53]
	Aw	170 (2)	1,21 [0,14 ; 4,29]	1,18 [0,14 ; 4,12]
	Am	135 (2)	1,53 [0,18 ; 5,41]	1,48 [0,18 ; 5,15]
	A (w+m)	305 (4)	1,35 [0,37 ; 3,33]	1,31 [0,36 ; 3,29]
	gesamt	920 (12)	1,34 [0,70 ; 2,33]	1,30 [0,68 ; 2,26]
Amberg	N	335 (0)	0,00 [0,00 ; 1,07]	0,00 [0,00 ; 1,09]
	Aw	190 (2)	1,08 [0,13 ; 3,83]	1,05 [0,13 ; 3,70]
	Am	130 (0)	0,00 [0,00 ; 2,80]	0,00 [0,00 ; 2,76]
	A (w+m)	320 (2)	0,63 [0,08 ; 2,18]	0,63 [0,08 ; 2,22]
	gesamt	655 (2)	0,31 [0,04 ; 1,08]	0,31 [0,04 ; 1,09]
Rosenheim	N	335 (1)	0,30 [0,01 ; 1,61]	0,30 [0,01 ; 1,64]
	Aw	110 (0)	0,00 [0,00 ; 3,30]	0,00 [0,00 ; 3,24]
	Am	125 (0)	0,00 [0,00 ; 2,91]	0,00 [0,00 ; 2,87]
	A (w+m)	235 (0)	0,00 [0,00 ; 1,56]	0,00 [0,00 ; 1,55]
	gesamt	570 (1)	0,18 [0,00 ; 0,96]	0,18 [0,00 ; 0,97]
Dachau	N	340 (0)	0,00 [0,00 ; 1,05]	0,00 [0,00 ; 1,07]
	Aw	145 (0)	0,00 [0,00 ; 2,51]	0,00 [0,00 ; 2,48]
	Am	155 (0)	0,00 [0,00 ; 2,35]	0,00 [0,00 ; 2,32]
	A (w+m)	300 (0)	0,00 [0,00 ; 1,19]	0,00 [0,00 ; 1,21]
	gesamt	640 (0)	0,00 [0,00 ; 0,57]	0,00 [0,00 ; 0,57]
München	N	340 (0)	0,00 [0,00 ; 1,05]	0,00 [0,00 ; 1,07]
	Aw	130 (0)	0,00 [0,00 ; 2,80]	0,00 [0,00 ; 2,76]
	Am	175 (0)	0,00 [0,00 ; 2,09]	0,00 [0,00 ; 2,06]
	A (w+m)	305 (0)	0,00 [0,00 ; 1,17]	0,00 [0,00 ; 1,20]
	gesamt	645 (0)	0,00 [0,00 ; 0,56]	0,00 [0,00 ; 0,57]
alle Standorte	N	1965 (9)	0,46 [0,21 ; 0,87]	0,46 [0,21 ; 0,87]
	Aw	745 (4)	0,54 [0,15 ; 1,36]	0,54 [0,15 ; 1,36]
	Am	720 (2)	0,28 [0,03 ; 0,99]	0,28 [0,03 ; 0,99]
	A (w+m)	1465 (6)	0,41 [0,15 ; 0,89]	0,41 [0,15 ; 0,88]
	gesamt	3430 (15)	0,44 [0,25 ; 0,72]	0,44 [0,24 ; 0,72]

4.4 Nachweis der 16S rRNA von *I. ricinus*

Bei den zehn Prozent aller untersuchten Proben, die nach dem Zufallsprinzip für den Nachweis von 16S rRNA von *I. ricinus* ausgewählt wurden, zeigte die real-time RT-PCR in allen Fällen ein positives Ergebnis. Auch nach vorhergehender Inkubation mit DNase I (Invitrogen, Karlsruhe) konnte in allen Proben 16S rRNA von *I. ricinus* nachgewiesen werden. Dabei war die Negativkontrolle jeweils negativ.

4.5 Sequenzanalysen des viralen E-Gens

Der FSME-Nachweis mittels real-time RT-PCR der 3'-NCR wurde in einer konventionellen PCR durch die Amplifikation eines 1588 bp großen Fragmentes der E-Gen-Region bestätigt (Abb. 20).

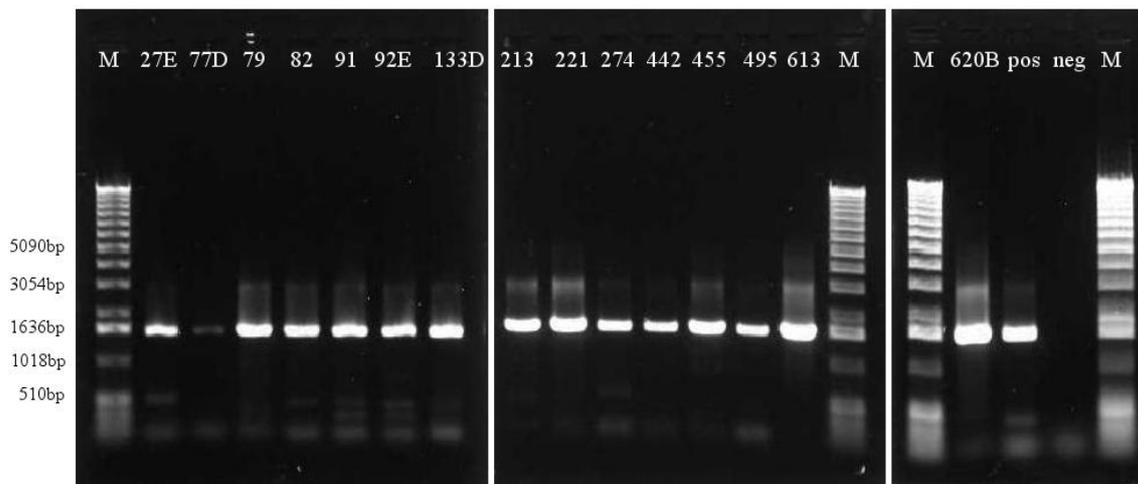


Abb. 20: Auftrennung der PCR-Produkte im 1%igen Agarosegel nach Amplifikation der E-Gen-Region mit dem Primerpaar TBE-EF10 / TBE-NS1R109. M: 1Kb DNA Ladder, pos: Positivkontrolle, neg: Negativkontrolle.

Bei 14 von 15 sequenzierten Proben wurde die Nukleotidsequenz von Position 54 bis 1488 des E-Gens eindeutig bestimmt und für die weitere phylogenetische Analyse verwendet. In diesem Bereich wiesen neun Proben des Standortes Passau eine 100%ige Übereinstimmung auf, dieser Genotyp wird nachfolgend als PA I bezeichnet (Tab. 15). Die Sequenz einer weiteren Probe aus Passau unterschied sich hiervon in

acht Nukleotid-Positionen (Probe 455, Genotyp PA II) und eine dritte in einer Position (Probe 620B, Genotyp PA III). Die Sequenz der einzigen im FSME-Nachweis positiven Probe des Standortes Rosenheim (Probe 221, Genotyp RO I) stimmte in allen Positionen mit PA I überein. Am Standort Amberg konnte aus zwei Proben (133D und 495) RNA des FSME-Virus isoliert werden, diese unterschieden sich in der Sequenz des E-Gens in einer Nukleotid-Position (AM I und AM II). Ein Alignment der ermittelten Nukleotid-Sequenzen im Vergleich zu der entsprechenden Sequenz des Stammes Neudoerfl ist im Anhang unter 12.3 dargestellt.

Für die Probe 77D aus Passau, bei der sich das Amplifikat nur in einer sehr schwachen Bande darstellte (Abb. 20), war es nicht möglich, die Sequenz für den gesamten Bereich eindeutig zu ermitteln. In einem 1213 nt langen Kernbereich, von Nukleotid 194 bis Nukleotid 1406 des E-Gens, wies die Sequenz aber eine 100%ige Übereinstimmung mit PA I auf. Alle in dieser Studie erhaltenen Sequenzen wurden an die Genbank des *National Center for Biotechnology Information* übermittelt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Tab. 15: Zuordnung der Proben zu Genotypen nach Sequenzierung.

Genotyp-Bezeichnung	Probenkennzeichnung	Genbanknummer
AM I	133D	FJ360845
AM II	495	FJ360846
PA I	27E, 79, 82, 91, 92E, 213, 274, 442, 613, 77D *	FJ360847
PA II	455	FJ360848
PA III	620B	FJ360849
RO I	221	FJ360850

* In dem sequenzierten Bereich (Nukleotid 194 bis Nukleotid 1406 des E-Gens) wies die Probe 77D eine 100%ige Übereinstimmung mit den übrigen Proben der Gruppe PA I auf.

Auf Aminosäureebene fand sich innerhalb des sequenzierten Bereichs eine 100%ige Homologie zwischen den Genotypen AM I und AM II einerseits sowie zwischen PA I, PA III und RO I andererseits. PA II unterschied sich von den anderen Genotypen des Standortes Passau in einer Aminosäureposition. Insgesamt ergaben sich bezüglich

der Aminosäuresequenz der in dieser Studie identifizierten Genotypen vier, im Vergleich zu dem als Prototyp zu sehenden Stamm Neudoerfl fünf polymorphe Positionen. Die Unterschiede an den betreffenden Positionen sind in einer vergleichenden Übersicht in Tab. 16 dargestellt.

Vergleiche innerhalb des Europäischen Subtyps des FSME-Virus zeigten einen hohen Grad an Übereinstimmung des untersuchten Bereichs sowohl auf Nukleotid- (98,1 % bis 100 %) als auch auf Aminosäureebene (94,1 % bis 100 %). Zwischen dem Europäischen und dem Sibirischen Subtyp lag die Übereinstimmung bei mindestens 95,6 % auf Nukleotid- und 83,8 % auf Aminosäureeben, während der Vergleich mit dem Fernöstlichen Subtyp Identitäten von mindestens 94,1 % bzw. 82,6 % ergab. Auch im Vergleich mit anderen Flaviviren, wobei Sequenzen des Louping ill Virus, Omsk Hemorrhagic Fever Virus, Langat Virus, Kyasanur Forest Disease Virus und Powassan Virus einbezogen wurden, zeigte sich mit Übereinstimmungen von 77,4 % bis 93,9 % in den Nukleotid- bzw. 68,9 % bis 87,2 % in den Aminosäuresequenzen eine große Ähnlichkeit in dieser Region. Eine Liste der verwendeten Sequenzen findet sich in Tab. 24, Anhang 12.3, die erhaltenen Werte sind in Tab. 25, Anhang 12.3 dargestellt.

Tab. 16: Darstellung der polymorphen Aminosäurepositionen im Vergleich der bayerischen Genotypen mit dem Stamm Neudoerfl (Nummerierung beginnend mit der ersten Aminosäure des E-Proteins).

	Aminosäurepositionen				
	51	52	81	128	167
AM I, AM II	D	N	I	I	V
PA I, PA III, RO I	E	S	T	T	V
PA II	E	N	T	T	V
Neudoerfl	E	N	T	T	I

D: Asparaginsäure, E: Glutaminsäure, I: Isoleucin, S: Serin, T: Threonin, V: Valin

4.6 Phylogenetische Analysen

Die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen, die anhand von „Distance-Matrix“- , „Maximum-Parsimony“- und „Maximum-Likelihood“-Analysen erhalten wurden, sind als phylogenetische Stammbäume in Abb. 21 bis Abb. 23 dargestellt. Die Referenzen aller verwendeten Sequenzen sind in Tab. 24, Anhang 12.3 aufgelistet.

Alle drei Methoden führten zu im Wesentlichen übereinstimmenden Stammbäumen. Dabei zeigten sich drei Cluster, die dem Europäischen, dem Sibirischen und dem Fernöstlichen Subtyp des FSME-Virus entsprachen. Die Sequenzen der E-Gene der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Viren gliederten sich eindeutig in den Europäischen Subtyp ein, wobei einerseits die aus Amberg stammenden Genotypen und andererseits diejenigen aus Passau und Rosenheim deutlich abgegrenzte Gruppen bildeten (Abb. 21 bis Abb. 23).

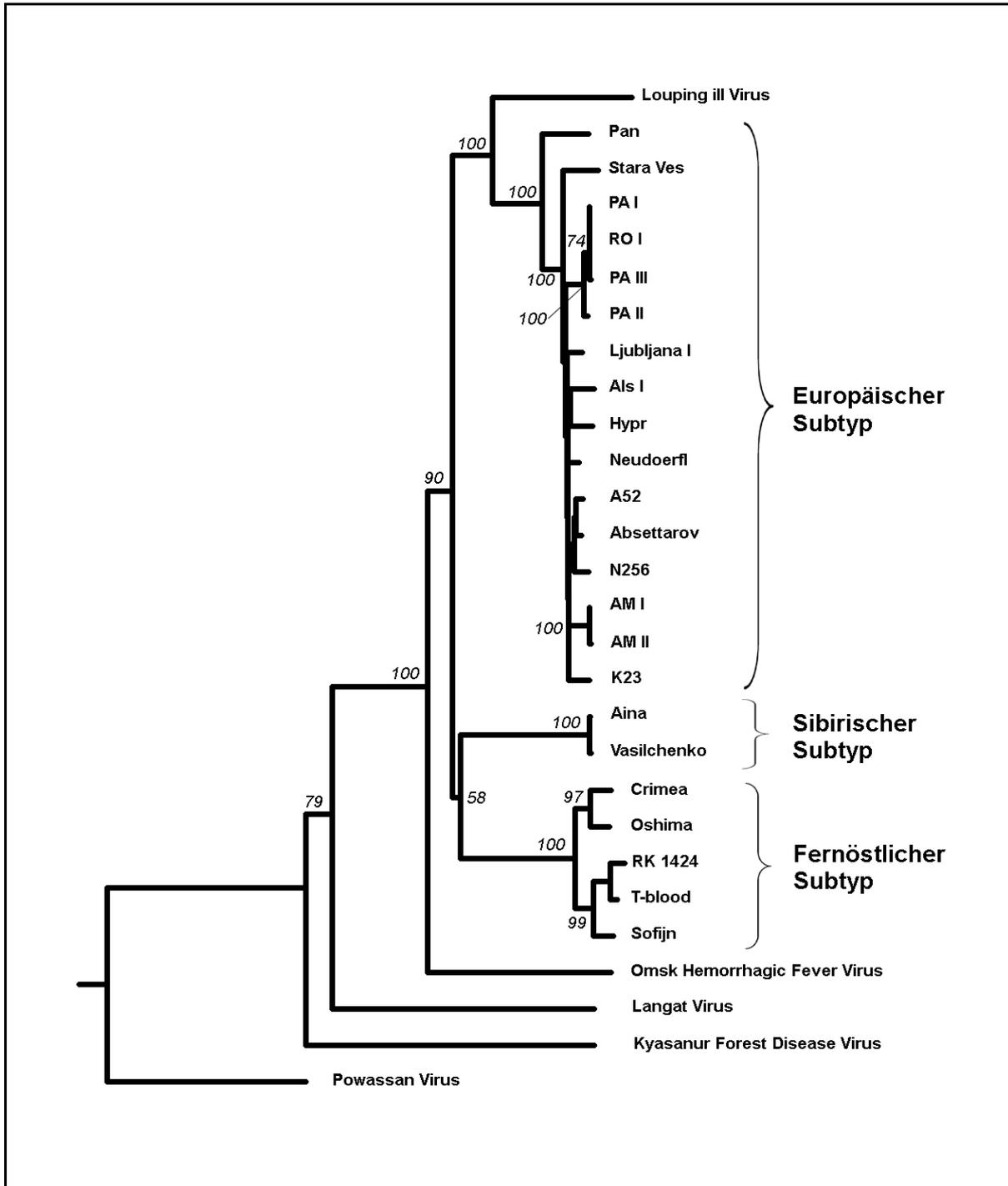


Abb. 21: Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Basis der Nukleotide 54 bis 1488 des E-Gens der FSME-positiven Proben und Vergleichssequenzen aus der Genbank. Verfahren: „Distance-Matrix“, Bootstrap-Analyse mit 1000 Wiederholungen. Bootstrap-Werte in Prozent sind an den Hauptknotenpunkten als kursive Zahlen angegeben.

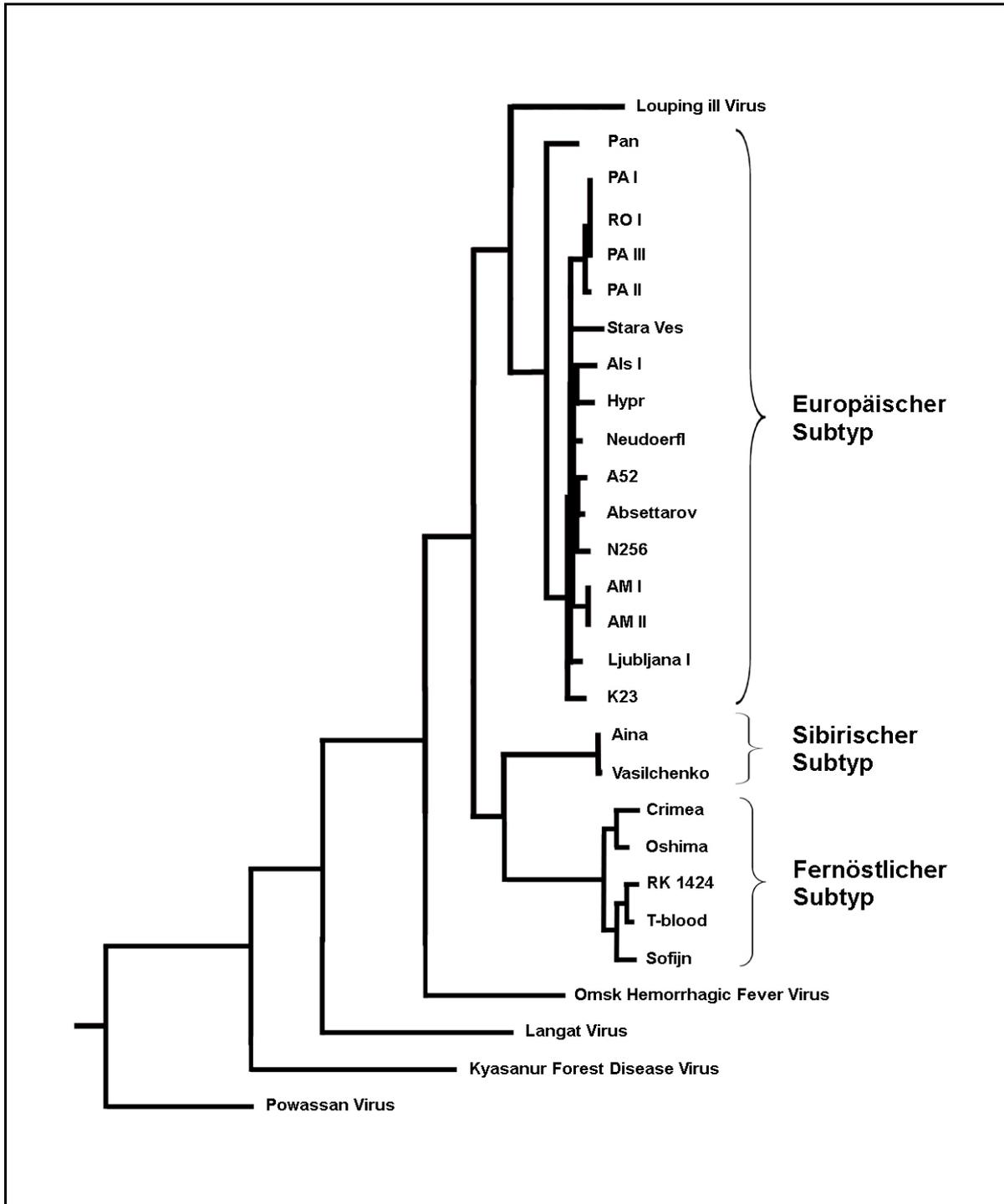


Abb. 22: Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Basis der Nukleotide 54 bis 1488 des E-Gens der FSME-positiven Proben und Vergleichssequenzen aus der Genbank. Verfahren: „Maximum-Likelihood“.

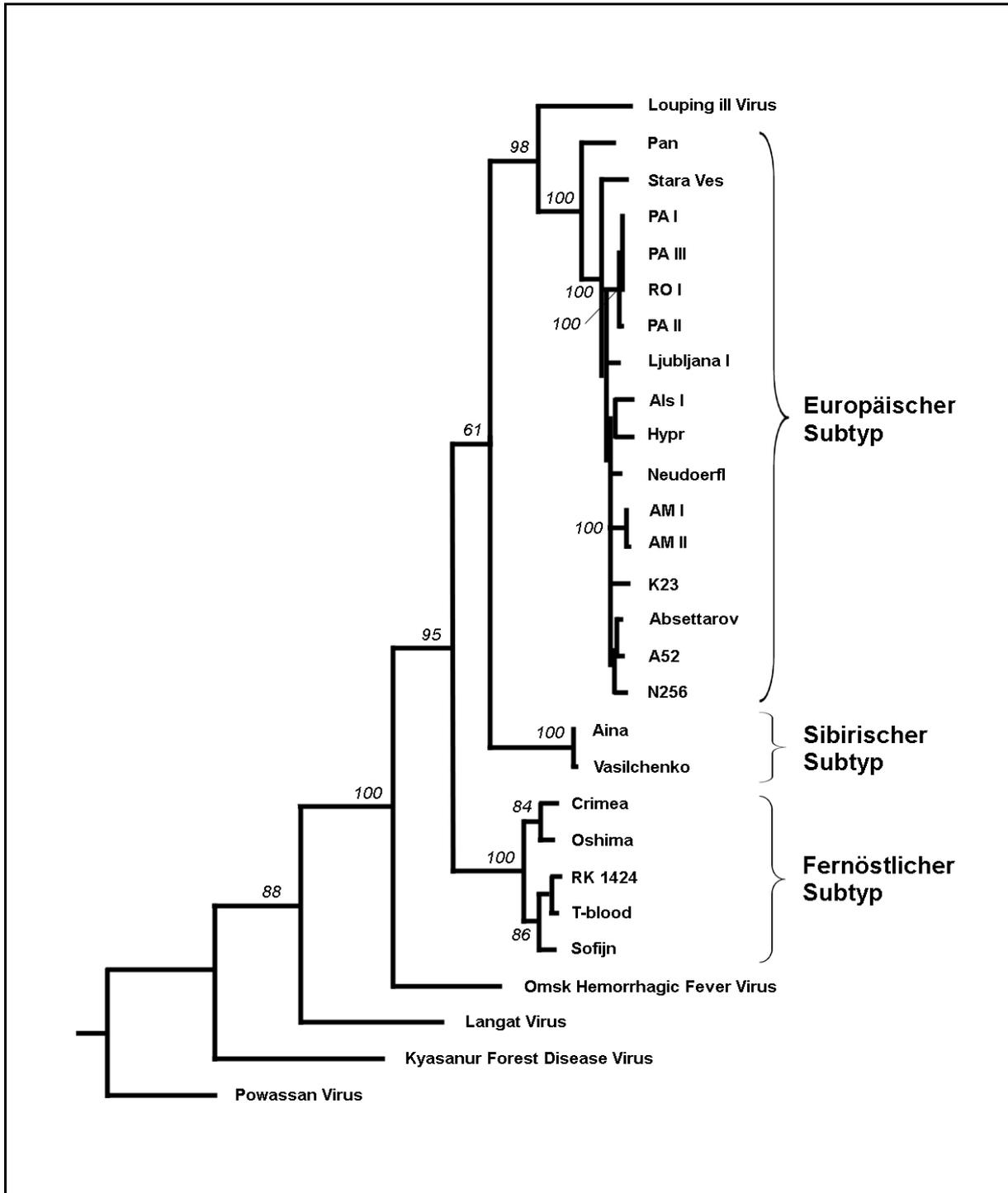


Abb. 23: Phylogenetischer Stammbaum erstellt auf Basis der Nukleotide 54 bis 1488 des E-Gens der FSME-positiven Proben und Vergleichssequenzen aus der Genbank. Verfahren: „Maximum-Parsimony“, Bootstrap-Analyse mit 1000 Wiederholungen. Bootstrap-Werte in Prozent sind an den Hauptknotenpunkten als kursive Zahlen angegeben.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse zum Vorkommen und zur saisonalen Aktivität von *I. ricinus*

Zur Untersuchung der saisonalen Aktivität von *I. ricinus* wurden Zecken mittels Zeckenfahnen von der Vegetation gesammelt und quantitativ erfasst. Hierfür wurde ein standardisiertes Verfahren verwendet, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sowohl zwischen den Sammelterminen an jedem Standort als auch zwischen den verschiedenen Standorten zu gewährleisten. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden dabei ausschließlich Zecken der Art *I. ricinus* gefunden. Zwar stellt sie in Zentraleuropa die häufigste und bedeutendste Zeckenart dar, dennoch wird die Zeckenpopulation zu einem geringen Anteil auch durch Schildzecken der Gattungen *Dermacentor*, *Haemaphysalis* und eventuell auch *Rhipicephalus* sowie durch andere Arten der Gattung *Ixodes* wie z.B. *I. hexagonus*, *I. canisuga* und *I. trianguliceps* gebildet (Aeschlimann, 1972; Liebisch *et al.*, 1985; Hillyard, 1996). Dass dennoch ausschließlich *I. ricinus* gefunden wurde, liegt zum einen in der Selektion durch die verwendete Fangtechnik begründet: So werden mittels Zeckenfahnen nur Zecken erfasst, die sich wie *I. ricinus* exophil verhalten und sich während der aktiven Wirtssuche von der Vegetation abstreifen lassen. Dagegen werden endophile Arten, wie z.B. *I. hexagonus*, oder *I. canisuga*, die sich in Nestern und Bauten ihrer Wirte aufhalten, zwar bei Untersuchung ihrer Wirtstiere gefunden, nicht jedoch mittels Zeckenfahnen erfasst. Untersuchungen, die dieselbe Fangmethodik verwendeten, zeigten ähnliche Ergebnisse (Kiessling, 2005; Silaghi *et al.*, 2008). Zum anderen weisen manche zentraleuropäische Zecken ein lokal verschiedenes Verbreitungsmuster auf. So wurde zwar in den letzten Jahren von einer Ausbreitung der Art *Dermacentor reticulatus* berichtet, wobei sie aber insbesondere im Saarland, in Brandenburg und in der Rheinebene, jeweils in fokal begrenzten Gebieten, nachgewiesen wurde (Dautel *et al.*, 2006; Heile *et al.*, 2006; Beelitz *et al.*, 2008; Mandl *et al.*, 2008). Auch in Bayern wurde *D. reticulatus* nachgewiesen, und zwar im Raum München, bei Regensburg, im Maintal bei Würzburg sowie nördlich von Bamberg. Es wurden aber vorwiegend offene buschreiche Graslandschaften und Flussauen besiedelt (Zahler, 1994; Zahler *et al.*, 2000; Beelitz *et al.*, 2008). Daher

war ein Vorkommen dieser Art an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Standorten nicht zu erwarten.

Die festgestellten Anteile der aktiven Stadien von *I. ricinus* unterschieden sich stark zwischen den verschiedenen Standorten. Insbesondere an den Standorten München und Dachau lag der Anteil der Larven an der Gesamtzahl der Zecken mit 13,5 % und 14,0 % deutlich niedriger als an den übrigen Standorten. Es ist jedoch möglich, dass gerade für diese Standorte der Anteil der gefundenen Larven unterschätzt wurde. Die verwendete Fangmethodik, aufgrund derer bei dichtem und hohem Bewuchs Larven, die sich in Bodennähe aufhalten, nicht erfasst werden (Ginsberg und Ewing, 1989; Gray, 1991), erscheint als mögliche Ursache unwahrscheinlich, da der Bewuchs in der Krautschicht in München und Dachau in seiner Struktur den übrigen Standorten ähnlich erschien. Weiterhin ist die spezielle räumliche Verteilung der Larven zu berücksichtigen: Da diese sich kaum horizontal fortbewegen, werden sie nach dem Schlüpfen in großer Anzahl nahe der Stelle der Eiablage gefunden und nur dann durch die Zeckenfahne erfasst, wenn diese exakt über die entsprechende Stelle streift (Aeschlimann, 1972). Insbesondere an Standorten mit einer geringen Zeckenzahl wie in München und Dachau können so die wenigen Stellen, an denen gehäuft Larven vorkommen, verfehlt werden.

Untersuchungen anderer Autoren haben gezeigt, dass trotz vielfältiger Einflussfaktoren im Bezug auf die Sammeltechnik eine Schätzung der tatsächlichen Zeckendichte anhand der mittels Zeckenfahne gesammelten Individuenzahl möglich ist, da ein deutlicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen besteht (Aeschlimann, 1972; Sonenshine, 1993; Gray *et al.*, 1998). An den Standorten München und Dachau wurde die Zeckendichte anhand der Anzahl gesammelter Zecken bezogen auf 100 m² als vergleichsweise gering, in Passau dagegen als hoch eingeschätzt. Als Ursache hierfür sind Unterschiede in den vorkommenden Wirtstieren denkbar, die einen Einfluss auf die Zeckendichte haben: So können eine hohe Dichte von Mäusen und anderer bevorzugter Wirte auch die Dichte der Zecken positiv beeinflussen. Diese Parameter wurden in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht quantitativ erfasst. Diejenigen Standorte, an denen in dieser Studie geringe Zeckenzahlen gefunden wurden, werden von Menschen in ihrer Freizeit stark frequentiert. Zudem liegt der Standort München in direkter Nähe eines Wohngebietes. Sowohl Menschen als auch deren Haustiere wie Hunde, Katzen und

Pferde werden von *I. ricinus* als Wirte genutzt. Es ist nicht auszuschließen, dass in diesen Fällen die Zecken von den genannten Wirten aus ihrem Biotop entfernt werden oder vor Vollendung der Blutmahlzeit entdeckt und beseitigt werden. Folglich wäre an diesen Standorten von einer dauernden Schmälerung der Zeckenpopulation auszugehen, was zu einer insgesamt geringeren Zeckendichte beitragen könnte.

Während im Sammeljahr 2006 noch im März eine geschlossene Schneedecke vorhanden war, wurde in 2007 ein verhältnismäßig früher Anstieg der Temperaturen im Frühjahr beobachtet, was eine bereits in Februar oder März einsetzende Zeckenaktivität und ein früheres Erreichen der maximalen Aktivität zur Folge hatte. Der vorausgehende milde Winter bot insbesondere den gegen tiefe Temperaturen empfindlicheren juvenilen Zeckenstadien gute Überlebenschancen, so dass die in 2007 beobachtete größere Individuenzahl sich hieraus ableiten lässt. Einschränkend muss allerdings bemerkt werden, dass gleichbleibend geringe Zeckenzahlen wie z.B. am Standort München keine statistisch belastbare Aussage erlauben. Insgesamt steht die festgestellte saisonale Aktivität von *I. ricinus* in Einklang mit publizierten Daten, die Aktivitätsmaxima von *I. ricinus* im Frühjahr und zu Beginn des Sommers beschreiben, auf die nach verringerter Aktivität während der Sommermonate ein zweites, kleineres Maximum im Herbst folgen kann (MacLeod, 1936a; Aeschlimann, 1972; Gray, 1991; Sonenshine, 1993; Perret *et al.*, 2000; Gray, 2002). Dabei war an den Standorten Passau, Amberg und Rosenheim eine zeitgleiche Aktivität von Larven und Nymphen klar erkennbar, während die niedrigen Zeckenzahlen an den Standorten München und Dachau diesbezüglich keine sichere Aussage ermöglichen.

Temperatur und Luftfeuchtigkeit haben einen großen Einfluss auf die Aktivität und das Überleben wirtsferner Zecken, daher wurden diese Parameter auf der Suche nach möglichen Ursachen der festgestellten Unterschiede zwischen den einzelnen Standorten bezüglich Häufigkeit und Aktivität der Zecken betrachtet. Die während der Sammeltermine an einer zentralen Stelle des Standortes in Bodennähe gemessenen Werte der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit entsprechen am ehesten dem Mesoklima des Standortes und stellen damit die bestmögliche verfügbare Information über die aktuell an dieser Stelle auf die Zecken wirkenden Einflüsse dar, auch wenn sie keine direkte Aussage über das Mikroklima zulassen. Die Untersuchung einer Korrelation und die Regressionsanalyse der Zahl gesammelter

Zecken mit den vor Ort gemessenen Werten ergaben systematisch für alle Entwicklungsstadien an allen Standorten eine positive Beziehung zwischen der Temperatur und der Aktivität der Zecken, was mit Angaben in der Literatur übereinstimmt (MacLeod, 1935a; MacLeod, 1936a; Perret *et al.*, 2000; Hubálek *et al.*, 2003).

Die beobachtete Aktivität der Larven setzte ab einer minimalen Temperatur von 7 °C ein, während bei Nymphen und adulten Zecken in der Regel ab 5 °C aktive Individuen festzustellen waren. Einzelne Zecken wurden auch bei Temperaturen unterhalb des in der Literatur angegebenen Schwellenwertes von 5 °C gefunden (vgl. Tab. 17 bis Tab. 21, Anhang 12.1; Lindgren *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2006), was in den am Standort herrschenden Temperaturunterschieden begründet liegen kann, die z.B. bereits zwischen sonnigen und schattigen Flächen bestehen. Die Korrelations- und Regressionsanalysen der relativen Luftfeuchtigkeit und der Anzahl gesammelter Zecken ergaben in allen Fällen eine negative Beziehung. Dies erstaunt zunächst, da für das Überleben und die Aktivität von *I. ricinus* eine hohe Luftfeuchtigkeit nötig ist (MacLeod, 1936a; Gray, 1991; Gray, 2002) und folglich eine mit steigender Luftfeuchtigkeit ebenfalls zunehmende Aktivität der Zecken zu erwarten wäre. Allerdings lag ein großer Teil der gemessenen Werte oberhalb der nach Literaturangaben für das Vorkommen und die Aktivität von *I. ricinus* als minimal eingestuften relativen Luftfeuchtigkeit von 85 % (vgl. Tab. 17 bis Tab. 21, Anhang 12.1). Oberhalb dieses Grenzwertes werden andere Faktoren wie vor allem die Temperatur ausschlaggebend für die Zeckenaktivität. Vergleichbare Studien in Tschechien zeigten ebenfalls eine negative Korrelation zwischen der relativen Luftfeuchtigkeit und der Aktivität von *I. ricinus* (Hubálek *et al.*, 2003). Insgesamt wurde in den durchgeführten Korrelations- und Regressionsanalysen ein jeweils eindeutiger Trend festgestellt. Die zum Teil geringen Werte von R^2 verdeutlichen aber, dass neben den betrachteten Parametern auch weitere Faktoren berücksichtigt werden müssen, um die Beziehungen zwischen Umwelteinflüssen und der Anzahl aktiver Zecken adäquat zu beschreiben. Zu bedenken ist auch, dass die monatlich vor Ort gemessenen Werte nur Momentaufnahmen darstellen. Für detaillierte Analysen wäre es wünschenswert über einen längeren Zeitraum kontinuierliche Messungen am Standort durchzuführen und auch die Zahl der aktiven Zecken in kürzeren Abständen zu bestimmen.

Im Gegensatz zu den vor Ort gemessenen Werten spiegeln die von Wetterstationen aufgezeichneten Daten das Makroklima der Region wider. Sie wurden verwendet, um generelle Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen herauszustellen. Für die Region Passau ergaben sich dabei vergleichsweise kalte Wintertemperaturen, während in München insgesamt etwas höhere Temperaturen als an den anderen Standorten gemessen wurden. Bei der Interpretation dieser Daten ist die Lage der Wetterstationen und ihre Entfernung zum Sammelort zu beachten: Die Wetterstation München lag als einzige der gewählten Stationen mitten in einem Stadtgebiet. Bedingt durch die Stadtumgebung waren hier höhere Temperaturen zu erwarten. Da auch der Standort München, an dem Zecken gesammelt wurden, innerhalb der Stadt in einer waldähnlichen Parkanlage liegt, wurde die Wetterstation bewusst in dieser Lage gewählt, um möglichst repräsentative Werte zu erhalten. Die übrigen Wetterstationen befinden sich, ebenso wie die übrigen Standorte, in ländlichem Gebiet außerhalb von Städten.

Mit Werten zwischen 7076 mm (Standort Dachau, 2006) und 13298 mm (Standort Passau, 2007) wiesen die Niederschlagsmengen zwischen den Gebieten zwar Unterschiede auf, lagen aber jeweils weit über der für das Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* als minimal notwendig beschriebenen jährlichen Niederschlagsmenge von 800 mm (Grešiková und Calisher, 1989).

In dieser Studie wurden insgesamt zwischen den fünf einbezogenen Standorten keine deutlichen Unterschiede in den analysierten Daten der Wetterstationen, also im Makroklima, ermittelt. Diese Daten sind somit wenig geeignet lokale Unterschiede in der Häufigkeit und Aktivität von *I. ricinus* innerhalb eines begrenzten geographischen Gebietes wie Bayern zu erklären. Möglicherweise erlauben sie aber Rückschlüsse auf die Zeckenhäufigkeit und -saisonalität in geographisch weiter entfernt liegenden Regionen, z.B. innerhalb Europas. Diese Fragestellung soll im Rahmen des EU-Projektes EDEN auch unter Einbeziehung der hier vorgestellten Daten untersucht werden.

Neben dem Einfluss des lokalen Klimas auf das Vorkommen und die saisonale Aktivität von *I. ricinus* wurde auch ein Einfluss auf das Vorkommen des FSME-Virus diskutiert. So fanden Randolph *et al.* (2000) bei Untersuchungen des Makroklimas verschiedener Regionen Europas heraus, dass die herbstliche Abkühlungsrate mit dem FSME-Vorkommen korreliert: Regionen, in denen das FSME-Virus vorkommt,

wiesen eine größere herbstliche Abkühlungsrate auf als Regionen, die als FSME-frei gelten. Einen schnellen Temperaturabfall im Herbst sahen die Autoren in Verbindung mit hohen sommerlichen Temperaturen als notwendige Voraussetzung für eine effektive Übertragung des FSME-Virus durch *Cofeeding* zwischen Nymphen und Larven. Denn eine rasche Abkühlung im Herbst bewirkt, dass Larven aus Gelegen desselben Jahres nach dem Schlüpfen zunächst in Diapause überwintern, bevor sie mit steigenden Temperaturen des nächsten Frühjahres zeitgleich mit den Nymphen aktiv werden. In der vorliegenden Arbeit allerdings ist visuell anhand der verwendeten Daten zum Temperaturverlauf kein deutlicher Trend zu einem schnelleren Temperaturabfall im Herbst an Standorten mit Vorkommen des FSME-Virus im Vergleich zu den übrigen Standorten erkennbar. Synchroner Aktivitätsmuster von Larven und Nymphen, die von Randolph *et al.* (2000) als notwendige Bedingung für die Verbreitung des FSME-Virus innerhalb der Zeckenpopulation durch *Cofeeding* und damit für die Entstehung eines Naturherdes gesehen werden, wurden an den Standorten mit FSME-Vorkommen, also in Passau, Amberg und Rosenheim, beobachtet. Diese Ergebnisse stützen demnach die Hypothese von Randolph *et al.* (2000) zur Bedeutung des *Cofeedings* für die Verbreitung des FSME-Virus. In München und Dachau, also an Standorten, an denen kein FSME-Virus in den Zecken nachgewiesen wurde und die durch das RKI nicht als Risikogebiete klassifiziert waren, war die Anzahl gesammelter Larven gering. Hier konnten im Gegensatz zu den übrigen Standorten keine deutlichen Aktivitätsmaxima dieses Entwicklungsstadiums festgestellt werden. Ob ein fehlendes FSME-Vorkommen also tatsächlich mit dem Fehlen einer synchronen Aktivität der Larven und Nymphen verbunden ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

In der Literatur werden mögliche Auswirkungen der globalen Klimaerwärmung auf die Zeckenpopulation sowie auf die Verbreitung der durch Zecken als Vektoren übertragenen Erreger diskutiert. Einige Untersuchungen konnten eine zunehmende Ausdehnung des Verbreitungsgebietes von *I. ricinus* nach Norden sowie in höhere Lagen zeigen, was die Autoren in erhöhten Temperaturen begründet sehen (Lindgren *et al.*, 2000; Daniel *et al.*, 2003, 2004; Zeman und Beneš, 2004). Neben einem Temperaturanstieg müssen jedoch weitere Auswirkungen des Klimawandels berücksichtigt werden. Hierzu zählen z.B. trockenere oder feuchtere Sommer, Überschwemmungen und Veränderungen in Flora und Fauna, die sich ebenfalls auf

die Verbreitung und Dichte der Zeckenpopulation auswirken können. Soll das Risiko eines Zeckenstiches für den Menschen und das damit verbundene Risiko einer Erregerübertragung für ein bestimmtes Gebiet geschätzt werden, so dürfen auch sozio-ökonomische Gesichtspunkte nicht außer Acht gelassen werden. Hierzu gehören unter anderem die Freizeitgestaltung der Menschen, die auch durch den Lebensstandard in einem Land oder einer Region beeinflusst wird, und zu einer vermehrten Exposition gegenüber Zecken führen kann, sowie Umstrukturierungen in der Landwirtschaft, die einen Einfluss auf die Lebensbedingungen der Wirtstiere und Zecken nimmt (Šumilo *et al.*, 2007; Šumilo *et al.*, 2008).

5.2 Diskussion der Ergebnisse des FSME-Nachweises sowie der Charakterisierung positiver Proben mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analysen

Bei der für den Nachweis des FSME-Virus verwendeten real-time RT-PCR handelt es sich um ein hoch sensitives und spezifisches Verfahren, durch das die drei Subtypen des FSME-Virus, also der Europäische, der Sibirische und der Fernöstliche Subtyp nachgewiesen werden können (Schwaiger und Cassinotti, 2003; Mantke *et al.*, 2007). Der Virus-Nachweis gelang im Rahmen dieser Studie ausschließlich aus Zecken von den Standorten Passau, Amberg und Rosenheim. Allerdings kann aufgrund eines fehlenden Erregernachweises, wie hier an den Standorten München und Dachau, das Vorkommen des FSME-Virus nicht sicher ausgeschlossen werden (Rehse-Küpper *et al.*, 1978). Das Datenmaterial lässt jedoch statistisch die Aussage zu, dass die tatsächliche Prävalenz an den Standorten München und Dachau mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % weniger als 0,57 % beträgt. Der Nachweis der 16S rRNA von *I. ricinus* diente dabei dem Ausschluss von falsch negativen Ergebnissen des FSME-Nachweises, die durch Mängel in der RNA-Extraktion oder durch Inhibition der real-time RT-PCR aufgrund von Substanzen im Probenmaterial, wie z.B. Phenolen oder Hämoglobinabbauprodukten, verursacht werden könnten. Eine erfolgreiche RNA-Extraktion und Elimination von Inhibitoren konnte dabei in allen getesteten Proben belegt werden. Dass es sich hierbei tatsächlich um den Nachweis von RNA und nicht von 16S rDNA handelte, wurde zudem durch

Inkubation von Aliquots derselben Proben mit einer DNase und anschließender Wiederholung der real-time RT-PCR bestätigt.

Aufgrund der insgesamt geringen Prävalenz von unter 1,4 % und der Feststellung, dass in fünf getesteten positiven Pools, die aus Homogenisaten von Einzelzecken gebildet wurden, jeweils nur eine infizierte Zecke enthalten war, wurde angenommen, dass eine gepoolte Probe maximal eine Virus-tragende Zecke enthielt. Daher wurden als Vergleichswerte neben der Prävalenz für gepoolte Proben auch die minimale Infektionsrate (MIR, vgl. Kapitel 3.5) berechnet. Die für gepoolte Proben ermittelten Prävalenzen in den untersuchten Gebieten lagen zwischen 0 % [95 %-Konfidenz-Intervall: 0,00 % ; 0,56 %] und 1,34 % [95 %-KI: 0,70 % ; 2,33 %], wobei der Standort Passau eine deutlich höhere Prävalenz als die übrigen Standorte aufwies. Interessanterweise lässt sich aus den hier dargestellten Ergebnissen zur FSME-Prävalenz in Zecken eine Klassifizierung der Standorte in Risikogebiete ableiten, die identisch mit der vom RKI verwendeten Fallzahl-basierten Einteilung ist, und sogar eine Abgrenzung von Passau als Hochrisikogebiet begründet. Die hier verwendete Methode empfiehlt sich daher als Alternative, die von Einflussfaktoren wie der Durchimpfungsrate in der Bevölkerung unabhängig ist und somit eine verlässliche Einschätzung des FSME-Infektionsrisikos ermöglicht.

Die Prävalenz des FSME-Virus in den untersuchten Nymphen aller Standorte betrug 0,46 %, diejenige aller adulter Weibchen und Männchen 0,41 %. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, bei denen die FSME-Prävalenz in adulten Zecken höher war als in Nymphen (Grešiková *et al.*, 1968; Danielova *et al.*, 2002b; Süss *et al.*, 2004). Als Erklärung für höhere Prävalenzwerte in adulten Zecken wurde angeführt, dass die transovarielle Übertragung des FSME-Virus eine untergeordnete Rolle spielt und das Virus vor allem transstadial weitergegeben wird, mit jeder Blutmahlzeit also die Wahrscheinlichkeit der Virus-Infektion ansteigt (Rehse-Küpper *et al.*, 1978; Sonenshine, 1993). Es stellt sich die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, vergleichsweise hohe Prävalenz in Nymphen durch die Abbildung eines dynamischen Geschehens, also einer aktuell ansteigenden Zahl der mit dem FSME-Virus infizierten Nymphen, bedingt ist, was einen Anstieg der Prävalenz in adulten Zecken erst im Folgejahr nach sich ziehen würde. Auch andere Studien ermittelten vergleichsweise hohe Werte für Nymphen. So stellten Casati *et*

al. (2006) in einem FSME-Endemiegebiet der Schweiz Prävalenzen in Nymphen fest, die höher als diejenigen in adulten Zecken lagen.

Für die Sequenzierung der FSME-positiven Proben wurde das E-Gen ausgewählt, da durch dieses Gen wichtige Eigenschaften des Virus festgelegt werden und sich bereits einzelne Mutationen in einer veränderten Virulenz manifestieren können (Holzmann *et al.*, 1990; Labuda *et al.*, 1994; Holzmann *et al.*, 1997). In allen Fällen bestätigten die Ergebnisse der Sequenzierung das Vorliegen des FSME-Virus. Insgesamt wurden fünf verschiedene Genotypen von drei Standorten bestimmt, die sich deutlich zwei Clustern zuordnen ließen: Dabei wurde eine Gruppe von den aus Amberg stammenden Proben gebildet, die andere Gruppe von den an den Standorten Passau und Rosenheim identifizierten Viren. Bemerkenswert ist die Sequenzübereinstimmung von 100 % einer positiven Probe aus Rosenheim mit Proben aus Passau, da die zwei Standorte sowohl räumlich durch eine große Entfernung (122 km) als auch durch den Flusslauf der Donau als natürliche Grenze voneinander getrennt sind. Dennoch bleibt eine Verschleppung der Vektorzecke und damit des FSME-Virus durch natürliche Wirte nicht ausgeschlossen. Aufgrund der räumlichen Trennung kommen hierfür insbesondere Vögel als Wirte von *I. ricinus* in Frage.

Entscheidend für die Bedeutung einer Mutation auf Nukleotidebene ist, ob sie eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hat oder ob es sich um eine sogenannte stille Mutation handelt. Einzig für den Standort Passau wurde eine Kozirkulation von Viren festgestellt, deren Aminosäuresequenzen sich an einer Position unterscheiden. Interessant wäre es, in den kommenden Jahren zu untersuchen, ob beide Phänotypen nebeneinander fortbestehen oder ob eventuell nur eine der Ausprägungen auf Dauer Bestand hat.

Die für den Standort Amberg beschriebene Aminosäuresequenz des E-Gens weist in dem untersuchten Bereich vier Mutationen im Vergleich zu der Sequenz des Prototyps Neudoerfl auf. Dabei wurde der Austausch von Threonin durch Isoleucin an der Position 81 innerhalb des E-Proteins bisher allein für den Stamm Als I (Genbanknummer: AF091007) beschrieben. Zwei weitere Mutationen kommen unter den bisher veröffentlichten Sequenzen des FSME-Virus noch nicht vor. Hierbei handelt es sich um den Austausch von Glutaminsäure durch Asparaginsäure an der Position 51 und um den Austausch von Threonin durch Isoleucin an der Position 128.

Diese Positionen liegen innerhalb des E-Proteins in direkter Nähe (Position 51) oder innerhalb der Domäne II (Positionen 81 und 128), die vermutlich bei der Membranfusion während des Viruseintritts in die Zelle eine wichtige Funktion besitzt (Rey *et al.*, 1995; Roehrig *et al.*, 1989).

Obwohl die Virus-Prävalenz in *I. ricinus* am Standort Amberg mit 0,31 % [95 %-KI: 0,04 % ; 1,08 %] gering war, traten in den angrenzenden Wohngebieten in den vergangenen Jahren gehäuft schwere Krankheitsfälle auf. Allein in den Jahren 2003 bis 2005 erkrankten sieben Personen, von denen drei an den Folgen der Erkrankung verstarben (Böbenecker, 2007; Brey, 2007; K. Rausch, persönliche Mitteilung). Die in dieser Arbeit beschriebenen neuartigen Veränderungen an drei Aminosäurepositionen in einer für die Virulenz entscheidenden Proteinregion könnten möglicherweise eine Erklärung für diese Häufung schwerer Krankheitsfälle sein. So ist bekannt, dass bereits ein einziger Aminosäureaustausch in dieser Region zu einer Virulenzveränderung führen kann. Durch das Zusammenspiel mehrerer Punktmutationen wurden sogar kumulative Effekte festgestellt (Holzmann *et al.*, 1990; Labuda *et al.*, 1994; Holzmann *et al.*, 1997; Gritsun *et al.*, 2001). Ob die hier beschriebenen Mutationen allerdings einen Einfluss auf die Virulenz des Erregers besitzen, ist derzeit noch unbekannt. Um die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Eigenschaften des Virus näher zu charakterisieren, sind daher weiterführende Untersuchungen unbedingt erforderlich. Diese sollten z.B. die Charakterisierung des Virus-Wachstums in Zellkultur, des zytopathogenen Effekts und der Neuroinvasivität sowie die Beschreibung antigener Eigenschaften berücksichtigen. Es wäre ferner wünschenswert die Sequenzen weiterer kodierender und nicht kodierender Regionen der in Amberg gefundenen FSME-Stämme zu untersuchen, da Mutationen in diesen Bereichen sich ebenfalls auf die Virulenz des Virus auswirken können (Wallner *et al.*, 1996; McMinn, 1997). Auch Virusisolate von Patienten wären aufschlussreich, da sie einen direkten Vergleich zwischen dem klinischen Bild des jeweiligen Patienten und den molekularen Gegebenheiten des Virus ermöglichen.

Die beschriebenen Unterschiede auf Nukleotid- und Aminosäureebene spiegeln sich in den phylogenetischen Untersuchungen wider: Alle Sequenzen gliederten sich zwar eindeutig in den Europäischen Subtyp des FSME-Virus ein, die Viren aus Amberg einerseits und diejenigen aus Passau und Rosenheim andererseits bildeten aber eigene, voneinander getrennte Cluster und setzten sich von den als Vergleichs-

sequenzen herangezogenen Virusstämmen des Europäischen Subtyps ab. Die geographische Verbreitung der hier beschriebenen Genotypen in Bayern oder in anderen Regionen ist derzeit noch unklar. Weitere Untersuchungen in Verbindung mit Sequenzierungen des E-Gens, die zusätzliche Standorte einbeziehen, wären daher wünschenswert. Ob die festgestellten Mutationen einen Selektionsvorteil für die FSME-Viren bedeuten, ist noch unbekannt, ebenso wie mögliche qualitative und quantitative Unterschiede in dem auf die Viren wirkenden Selektionsdruck an den Standorten. Um festzustellen, ob die beschriebenen Veränderungen Bestand haben, bzw. ob noch weitere hinzu kommen, ist zudem eine Beobachtung derselben Standorte über einen längeren Zeitraum erforderlich.

5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Charakterisierung der saisonalen Aktivität von *I. ricinus*, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Übertragung des FSME-Virus von Nymphen auf Larven durch *Cofeeding*, ergab synchrone Aktivitätsmuster dieser Stadien an drei Standorten mit FSME-Vorkommen. Die niedrigen Zeckenzahlen und der geringe Anteil der Larven an zwei Standorten ohne nachgewiesenes Virus-Vorkommen ermöglichten diesbezüglich allerdings keine gesicherte Aussage. Somit stehen die gemachten Beobachtungen zwar mit der Hypothese in Einklang, dass synchrone Aktivität der juvenilen Zeckenstadien für die Etablierung eines FSME-Naturherdes notwendig ist (Randolph *et al.*, 2000), erfordern aber weiterführende Untersuchungen der fokalen Naturherd-Etablierung.

Die Ergebnisse bestätigen eine lokal unterschiedliche Prävalenz des FSME-Virus in *I. ricinus* für ausgewählte Standorte in Bayern und liefern einen wichtigen Beitrag zu der Einschätzung des aktuellen Infektionsrisikos für FSME. In den nächsten Jahren kann eventuell infolge einer Zunahme des Durchimpfungsgrades in der Bevölkerung kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Zahl der FSME-Erkrankungen und dem tatsächlichen Infektionsrisiko eines Gebietes vorausgesetzt werden (RKI, 2008). Daher sind Untersuchungen zur FSME-Prävalenz in Zecken, möglicherweise ergänzt durch serologische Studien in der Wirtstierpopulation, unabdingbar, um in Zukunft eine von Fallzahlen unabhängige und damit verlässliche Einschätzung des Infektionsrisikos und der epidemiologischen Entwicklung zu gewährleisten.

Die Sequenzierung des E-Gens FSME-positiver Proben zeigte für Viren des Standortes Amberg Mutationen in der Nukleotid- und Aminosäuresequenz, die hier erstmalig beschrieben wurden. Diese liegen in einer Genregion, deren Ausprägung die Virulenz des Virus beeinflusst. Eine Charakterisierung der Auswirkungen dieser Substitutionen ist daher dringend erforderlich, um die Folgen von Infektionen mit diesem Virus-Stamm abschätzen zu können.

Die Ergebnisse betonen, dass nicht allein die Prävalenz des Virus in Zecken sowie umweltbedingte und sozio-ökonomische Faktoren im Hinblick auf die Einschätzung des FSME-Risikos einer Region wichtig sind. Vielmehr müssen auch die durch genetische Charakteristika des Virus bedingten Eigenschaften wie die Virulenz in eine Risikobewertung einbezogen werden.

6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte die Untersuchung der saisonalen Aktivität von *I. ricinus* in Kombination mit der Prävalenz des FSME-Virus in Zecken an ausgewählten Standorten in Bayern zum Ziel. Hierzu wurden von April 2006 bis Dezember 2007 in den Kreisen München, Dachau, Rosenheim, Amberg und Passau in monatlichen Abständen Zecken gesammelt. Unterschiede zwischen den Standorten ergaben sich hinsichtlich der Zeckendichte sowie der Anteile der verschiedenen Entwicklungsstadien. Dabei war an Standorten mit FSME-Vorkommen eine zeitgleiche Aktivität von Larven und Nymphen erkennbar, wohingegen niedrige Zeckenzahlen mit geringen Larvenanteilen an Standorten, an denen kein FSME-Virus nachgewiesen wurde, diesbezüglich keine sichere Aussage ermöglichten. Die Ergebnisse stützen somit Aspekte der Hypothese, dass FSME-Naturherde nur an Standorten entstehen, an denen eine Virusübertragung via *Cofeeding* durch synchrone Aktivitätsmuster der juvenilen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* ermöglicht wird (Randolph *et al.*, 2000).

Nach Extraktion der RNA von 1965 Nymphen und 1465 Adulten der Art *I. ricinus* wurde eine real-time RT-PCR zum Nachweis des FSME-Virus eingesetzt. Die Prävalenzen an den einzelnen Standorten variierten von 0 % [95 %-KI: 0,0 % ; 0,6 %] bis 1,3 % [95 %-KI: 0,7 % ; 2,3 %]. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung des FSME-Vorkommens in *I. ricinus* mit der jeweiligen, auf Fallzahlen basierenden, Klassifizierung in Risikogebiete durch das Robert Koch-Institut. Die Sequenzierung des nahezu kompletten viralen E-Gens ergab insgesamt fünf Genotypen, welche sich nach phylogenetischer Analyse in zwei Clustern in den Europäischen Subtyp eingliederten. Auf Aminosäureebene zeigten sich im Vergleich zu der Sequenz des Stammes Neudoerfl fünf polymorphe Positionen, wobei drei der am Standort Amberg festgestellten Mutationen unter den veröffentlichten Sequenzen neuartig oder bisher nur einmalig beschrieben waren. Aufgrund der Lage dieser Mutationen in einer für die Virulenz entscheidenden Region ist ein Einfluss auf den klinischen Verlauf von Infektionen mit FSME-Viren dieses Stammes möglich.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Ermittlung der FSME-Infektionsrate in Zecken eine verlässliche Alternative zu der auf humanen Fallzahlen basierenden Einschätzung bildet. Zudem können auch die phänotypischen Eigenschaften des vorkommenden Virus für die Risikobeurteilung wichtig sein.

7. Summary

The aim of this study was to analyze the seasonal activity pattern of *I. ricinus* ticks and the prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks at selected sites in Bavaria, Germany. Therefore ticks were sampled in monthly intervals from april 2006 to december 2007 in the areas of Munich, Dachau, Rosenheim, Amberg and Passau. Differences in tick densities and in the proportions of developmental stages were identified between investigated sampling sites. Synchronous activity of larvae and nymphs was seen at sites positive for TBEV, whereas low tick numbers with a small proportion of larvae at sites negative for TBEV did not allow a conclusion about seasonal activity pattern. These results would support the hypothesis, that natural foci of TBEV develop, if juvenile tick stages show a synchronous activity pattern leading to virus-transmission from infected nymphs to larvae via cofeeding (Randolph *et al.*, 2000).

RNA was extracted from 1965 nymphs and 1465 adult *I. ricinus* ticks, followed by real-time RT-PCR for detection of TBEV. Prevalences ranged from 0 % [95 %-CI: 0.0 % ; 0.6 %] to 1.3 % [95 %-CI: 0.7 % ; 2.3 %] depending on the sampling site. These prevalence values for *I. ricinus* ticks were consistent with the current risk classification by the Robert Koch-Institut (German health authority), which is based on human TBE-case numbers. Sequencing of the nearly complete viral E-gene revealed five distinct genotypes. Phylogenetical analysis showed that these genotypes formed two clusters within the European subtype of TBEV. The deduced amino acid sequences differed in five positions compared to the sequence of prototype strain Neudoerfl. Three amino acid changes in viruses from sampling site Amberg were unique within the published sequences of TBEV or only described for one virus strain so far. These amino acid changes, which are located in a region with known importance for virulence, might influence the clinical picture of infections with this virus strain.

The results of this study demonstrate, that TBE-risk assessment based on infection rates in ticks is a reliable alternative to the risk assessment based on human case numbers. Additionally, characteristics of local virus strains seem to be of importance when determining the risk for human health in a given area.

8. Literaturverzeichnis

- Abel, U., Schosser, R., Süß, J., 1999.** Estimating the prevalence of infectious agents using pooled samples: biometrical considerations. *Zbl. Bakt.*, 289, 550–563.
- Aeschlimann, A., 1972.** *Ixodes ricinus*, Linné, 1758 (Ixodoidea: *Ixodidae*). Essai préliminaire de synthèse sur la biologie de cette espèce en Suisse. *Acta Trop.*, 29, 321–340.
- Alekseev, A. N., Chunikhin, S. P., 1990.** The exchange of the tick-borne encephalitis virus between ixodid ticks feeding jointly on animals with a subthreshold level of viremia. *Med. Parazitol. (Mosk.)*, 2, 48–50.
- Avšič-Županc, T., Poljak, M., Maticic, M., Radsel-Medvescek, A., LeDuc, J. W., Stiasny, K., Kunz, C., and Heinz, F. X., 1995.** Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. *Clin. Diagn. Virol.*, 4, 51–59.
- Babenko, L. V., 1974.** Daily fluctuations in the activity of starving nymphs of *Ixodes ricinus* L. and *Ixodes persulcatus* P. Sch. (Parasitiformes: *Ixodidae*). *Med. Parazitol. (Mosk.)* 43, 520–527.
- Bakhvalova, V. N., Rar, V. A., Tkachev, S. E., Matveev, V. A., Matveev, L. E., Karavanov, A. S., Dobrotvorsky, A. K., Morozova, O. V., 2000.** Tick-borne encephalitis virus strains of Western Siberia. *Virus. Res.*, 70, 1-12.
- Balashov, Y. S., 1972.** Bloodsucking ticks (Ixodoidea)–vectors of diseases of man and animals. *Misc. Pub. Entomol. Soc. Am.*, 8, 163–376.
- Beelitz, P., Wild, D., Wild, S., Pfister, K., 2008.** Aktuelles zu *Babesia-canis*-Infektionen bei Hunden in Bayern und Baden-Württemberg. *Kleintierpraxis*, 53, 88–94.

- Beer, A., 2007.** Persönliche Mitteilung. Bayrische Staatsforsten, Schöngesing.
- Belozеров, V. N., 1982.** Diapause and Biological Rhythms in Ticks. In: Obenchain, F. D., Galun, R. (eds.); Physiology of ticks. Pergamon Press. Oxford, New York, 469-500.
- Belozеров, V. N., Fourie, L. J., Kok, D. J., 2002.** Photoperiodic control of developmental diapause in nymphs of prostriate ixodid ticks (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol., 28, 163–168.
- Benda, R., 1958.** The common tick "*Ixodes ricinus* L." as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 2, 314–344.
- Blaškovič, D., 1967.** The public health importance of tick-borne encephalitis in Europe. Bull. Wld. Hlth. Org., 36, Suppl. 1, 5–13.
- Blaškovič, D., Nosek, J., 1972.** The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. Prog. Med. Virol., 14, 275–320.
- Böbenecker, W., 2007.** Durch Zecken übertragene Krankheiten: FSME und Lyme-Borreliose. Bayer. Ärztebl., 4, 182–186.
- Bormane, A., Lucenko, I., Duks, A., Mavtchoutko, V., Ranka, R., Salmina, K., Baumanis, V., 2004.** Vectors of tick-borne diseases and epidemiological situation in Latvia in 1993–2002. Int. J. Med. Microbiol., 293, Suppl. 37, 36–47.
- Brey, R., 2007.** Risikokommunikation in einem FSME- (Hoch-) Risikogebiet - der Öffentliche Gesundheitsdienst kämpft gegen das „Killervirus“. Vortrag, Kongress Medizin und Gesellschaft, 17.-21.09.2007.

- Campbell, M. S., Pletnev, A. G., 2000.** Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence. *Virology*, 269, 225–237.
- Casati, S., Gern, L., Piffaretti, J.-C., 2006.** Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (canton Bern). *J. Gen. Virol.*, 87, 2235–2241.
- Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., Rice, C. M., 1990.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Ann. Rev. Microbiol.*, 44, 649–688.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162, 156–159.
- Clarke, D. H., 1964.** Further studies on antigenic relationships among the viruses of the group B tick-borne complex. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31, 45–56.
- Daniel, M., 1993.** Influence of the microclimate on the vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* (L.) in central Europe. *Acarologia*, 34, 105–113.
- Daniel, M., Danielova, V., Križ, B., Beneš, C., 2006.** Tick-borne encephalitis. In: *Climate Change and Adaptation Strategies for Human Health*. Menne, B., Ebi, K. L. (Eds.). 189–205. Steinkopff, Darmstadt.
- Daniel, M., Danielova, V., Križ, B., Jirsa, A., Nozicka, J., 2003.** Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 22, 327–328.
- Daniel, M., Danielova, V., Križ, B., Kott, I., 2004.** An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *Int. J. Med. Microbiol.*, 293, Suppl. 37, 55–62.

- Danielova, V., Holubova, J., 1991.** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Modern Acarology*, 2, 7–10.
- Danielova, V., Holubova, J., Daniel, M., 2002a.** Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the South-Bohemian region of the Czech Republic. *Exp. Appl. Acarol.*, 26, 145–151.
- Danielova, V., Holubova, J., Pejcoch, M., Daniel, M., 2002b.** Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol.*, 49, 323–325.
- Dautel, H., Dippel, C., Oehme, R., Hartelt, K., Schettler, E., 2006.** Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296, Suppl. 40, 49–56.
- Dobler, G., Essbauer, S., Pfeffer, M., 2007.** FSME in Bayern: Ausweitung der Endemiegebiete, Erregernachweis in Zecken, Veränderung der Viren? *Bayer. Ärztebl.*, 4, 188–191.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clin. Inf. Dis.*, 28, 882–890.
- Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., Heinz, F. X., 1999.** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.*, 80, 179–185.
- Eckert, J., Friedhoff, K. T., Zahner, H., Deplazes, P., 2005.** Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgart, 343-363.
- Eistetter, S., Kimmig, P., Oehme, R., 1998.** Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME in Baden-Württemberg. *Bundesgesundheitsblatt*, 2, 62–66.

- Felsenstein, J., 2005.** PHYLIP Phylogeny Inference Package, Version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Feng, D.F. and Doolittle, R.F., 1987.** Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.*, 25, 351-360.
- Gallia, F., Rampas, J., Hollender, L., 1949.** Laboratorni infekce encefalitickym virem., *Cas. Lek. Ces.*, 88, 224–229.
- Gern, L., Rais, O., 1996.** Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 33, 189–192.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M., 1996.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 6, 995–1001.
- Ginsberg, H. S., Ewing, C. P., 1989.** Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 7, 313–322.
- Goldbrunner, H., 2006.** Persönliche Mitteilung. Verwaltung des Englischen Gartens München.
- Gray, J. S., 1991.** The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of lyme borreliosis. *Rev. Med.Vet. Entomol.*, 79, 323–333.
- Gray, J. S., 2002.** Biology of ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wien Klin Wochenschr*, 114, 473–478.

- Gray, J. S., Kahl, O., Robertson, J. N., Daniel, M., Estrada-Peña, A., Gettinby, G., Jaenson, T. G., Jensen, P., Jongejan, F., Korenberg, E., Kurtenbach, K., Zeman, P., 1998.** Lyme borreliosis habitat assessment. *Zbl. Bakt.*, 287, 211–228.
- Grešiková, M., Calisher, C., 1989.** Tick-borne encephalitis. In: *The arboviruses: Epidemiology and ecology*. Monath, T. P. (Ed.). 177–202. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Grešiková, M., Kožuch, O., Nosek, J., 1968.** Die Rolle von *Ixodes ricinus* als Vektor des Zeckenencephalititsvirus in verschiedenen mitteleuropäischen Naturherden. *Zbl. Bakt.*, I, Abt. Orig. 207, 423–429.
- Grešiková, M., Sekeyová, M., Stupalová, S., Necas, S., 1975.** Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. *Intervirology*, 5, 57–61.
- Grešiková, M., Sekeyová, M., Weidnerová, K., Blaškovič, D., Steck, F., Wandeler, A., 1972.** Isolation of tick-borne encephalitis virus from the brain of a sick dog in Switzerland. *Acta Virol.*, 16, 88.
- Gritsun, T. S., Desai, A., Gould, E. A., 2001.** The degree of attenuation of tick-borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations. *J. Gen. Virol.*, 82, 1667–1675.
- Gritsun, T. S., Frolova, T. V., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A., Venugopal, K., Gould, E. A., 1993a.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope gene of the Vasilchenko strain of TBE virus; comparison with other flaviviruses. *Virus Res.*, 27, 201–209.
- Gritsun, T. S., Gould, E. A., 1995.** Infectious transcripts of tick-borne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR. *Virology*, 214, 611–618.

- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A., 1993b.** Nucleotide and deduced amino acid sequence of the envelope glycoprotein of Omsk Haemorrhagic Fever Virus; comparison with other flaviviruses. *J. Gen. Virol.*, 74, 287–291.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., Gould, E. A., 2003.** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.*, 57, 129–146.
- Gritsun, T., Venugopal, K., Zanotto, P. M., Mikhailov, M., Sall, A., Holmes, E. C., Polkinghorne, I., Frolova, T. V., Pogodina, V. V., Lashkevich, V. A., and Gould, E. A., 1997.** Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Vir. Res.*, 49, 27–39.
- Guirakhoo, F., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Holzmann, H., Kunz, C., 1991.** Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. *J. Gen. Virol.*, 72, 1323–1329.
- Haglund, M., 2002.** Occurrence of TBE in areas previously considered being non-endemic: Scandinavian data generate an international study by the international scientific working group for TBE (ISW-TBE). *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, Suppl. 33, 50–54.
- Han, X., Aho, M., Vene, S., Peltomaa, M., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2001.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J. Med. Virol.*, 64, 21–28.
- Hartung, J., Elpelt, B., Klösener, K.-H., 1987.** Statistik. Oldenbourg, München.
- Hayasaka, D., Ivanov, L., Leonova, G. N., Goto, A., Yoshii, K., Mizutani, T., Kariwa, H., Takashima, I., 2001.** Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J. Gen. Virol.*, 82, 1319–1328.

- Hayes, S. F., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., 1980.** Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect. Immun.*, 27, 638–642.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., Williams, P. M., 1996.** Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 6, 986–994.
- Heile, C., Heydorn, A.-O., Schein, E., 2006.** *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) – Verbreitung, Biologie und Vektor von *Babesia canis* in Deutschland. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.*, 119, 330–334.
- Heinz, F. X., 2000.** Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L. (Eds.). 859–866. Academic Press.
- Heinz, F. X., 2003.** Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine*, 21, Suppl. 1, S3–S10.
- Hillyard, P. D., 1996.** *Ticks of North-West Europe.* The Dorset Press, Dorchester.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H., 1991.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' - 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 88, 7276–7280.
- Holzmann, H., Heinz, F. X., Mandl, C. W., Guirakhoo, F., Kunz, C., 1990.** A single amino acid substitution in envelope protein E of tick-borne encephalitis virus leads to attenuation in the mouse model. *J. Virol.*, 64, 5156–5159.

- Holzmann, H., Stiasny, K., Ecker, M., Kunz, C., Heinz, F. X., 1997.** Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice. *J. Gen. Virol.*, 78, 31–37.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., Juricová, Z., 2003.** Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *J. Vector Ecol.*, 28, 159–165.
- Jääskeläinen, A. E., Tikkakoski, T., Uzcátegui, N. Y., Alekseev, A. N., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2006.** Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1568–1571.
- Jones, L. D., Davies, C. R., Steele, G. M., Nuttall, P. A., 1987.** A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviraemic host. *Science*, 237, 775–777.
- Kiessling, J. R., 2005.** Untersuchung zum Vorkommen des Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus und *Borrelia burgdorferi* in ausgewählten Wildmaus- und Zeckenpopulationene Bayerns. [Dissertation] Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Korenberg, E. I., Gorban, L. Y., Kovalevskii, Y. V., Frizen, V. I., Karavanov, A. S., 2001.** Risk for human tick-borne encephalitis, borrelioses, and double infection in the pre-Ural region of Russia. *Emerg. Infect. Dis.*, 7, 459–462.
- Kunz, C., 1992.** Tick-borne encephalitis in Europe. *Acta Leiden.*, 60, 1–14.
- Labuda, M., Danielova, V., Jones, L. D., Nuttall, P. A., 1993a.** Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.*, 7, 339–342.

- Labuda, M., Jiang, W. R., Kaluzova, M., Kožuch, O., Nuttall, P. A., Weismann, P., Eleckova, E., Zuffova, E., Gould, E. A., 1994.** Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Vir. Res.*, 31, 305–315.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P. A., 1993b.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J. Med. Entomol.*, 30, 295–299.
- Labuda, M., Nuttall, P. A., 2004.** Tick-borne viruses. *Parasitology*, 129, S221–S245.
- Labuda, M., Nuttall, P. A., Kožuch, O., Elecková, E., Williams, T., Zuffová, E., Sabó, A., 1993c.** Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*, 49, 802–805.
- Labuda, M., Randolph, S. E., 1999.** Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zbl. Bakt.*, 289, 513–524.
- Liebisch, A., Brandes, R., Hoppenstedt, K., 1985.** Zum Befall von Hunden und Katzen mit Zecken und Flöhen in Deutschland. *Prakt. Tierarzt*, 66, 817–824.
- Lindenbach, B. D., Rice, C. M., 1999.** Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.*, 73, 4611–4621.
- Lindgren, E., 1998.** Climate and tickborne encephalitis. *Cons. Ecol. Online*, 2, 1–14.
- Lindgren, E., Gustafson, R., 2001.** Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet*, 358, 16–18.

- Lindgren, E., Tälleklint, L., Polfeldt, T., 2000.** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting european tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.*, 108, 119–123.
- Lundkvist, A., Vene, S., Golovljova, I., Mavtchoutko, V., Forsgren, M., Kalnina, V., Plyusnin, A., 2001.** Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus From Latvia: Evidence of Co-Circulation of Three Distinct Subtypes. *J. Med. Virol.*, 65, 730–735.
- MacLeod, J., 1935a.** *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. II. The factors governing survival and activity. *Parasitology*, 27, 123–144.
- MacLeod, J., 1935b.** *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. III: Climate and reproduction. *Parasitology*, 27, 489–500.
- MacLeod, J., 1936a.** *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. IV. An analysis of the ecological complexes controlling distribution and activities. *Parasitology*, 28, 295–319.
- MacLeod, J., 1936b.** Studies in tick-borne fever of sheep. II: Experiments on transmission and distribution of the disease. *Parasitology*, 28, 320–329.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X., Kunz, C., 1988.** Sequence of the structural proteins of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis with other flavivirus. *Virology*, 166, 197–205.
- Mandl, C. W., Heinz, F. X., Stöckl, E., Kunz, C., 1989.** Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses. *Virology*, 173, 291–301.
- Mandl, C. W., Holzmann, H., Kunz, C., Heinz, F. X., 1993.** Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology*, 194, 173–184.

- Mandl, D., Beelitz, P., Marholdt, F., Pfister, K., 2008.** Zur Verbreitung und Vorkommenshäufigkeit von *Babesia canis* und der Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*) im Saarland. [Poster] Tagung DVG-Fachgruppe Parasitologie und parasitäre Krankheiten, 09.-11.07.2008.
- Mantke, O. D., Aberle, S. W., Avšič-Županc, T., Labuda, M., Niedrig, M., 2007.** Quality control assessment for the PCR diagnosis of tick-borne encephalitis virus infections. *J. Clin. Virol.*, 38, 73–77.
- McMinn, P. C., 1997.** The molecular basis of virulence of the encephalitogenic flaviviruses. *J. Gen. Virol.*, 78, 2711–2722.
- Mejlon, H. A., Jaenson, T. G. T., 1997.** Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.*, 21, 747–754.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., 2003.** Molekulare Virologie. 168–187. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Monath, T. P., 1990.** Flaviviruses. In: *Fields Virology*. Fields, M. D., Knipe, D. M. (Eds.). 763–814. Raven Press New York.
- Murrell, A., Barker, S. C., 2003.** Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol.*, 56, 169–172.
- Nuttall, P. A., 1998.** Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology*, 116, Suppl., S65–S72.
- Nuttall, P. A., 1999.** Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zbl. Bakt.*, 289, 492–505.
- Nuttall, P. A., Labuda, M., 1994.** Tick-borne Encephalitis Subgroup. In: *Ecological Dynamics of Tick-Borne Zoonoses*. Sonenshine, E., Mather, T. N. (Eds.). 351–391. Oxford University Press.

- Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P., 2002.** Foci of tick-borne diseases in Southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, Suppl. 33, 22–29.
- Perret, J. L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L., 2000.** Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.*, 86, 554–557.
- Pfeffer, M., 2008.** Persönliche Mitteilung. Mikrobiologisches Institut, Sanitätsakademie der Bundeswehr, München.
- Pletnev, A. G., Yamshchikov, V. F., Blinov, V. M., 1990.** Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the poyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 174, 250–263.
- Pogodina, V. V., Bochkova, N. G., Koreshkova, G. V., 1981.** Properties of strains of tick-borne encephalitis virus with the Aina/1448 serotype. *Vopr. Virusol.*, 6, 741–746.
- Ponkratz, G., 2006.** Persönliche Mitteilung. Forstdienststelle Rosenberg, Sulzbach Rosenberg.
- Radda, A., Loew, J., Pretzmann, G., 1963.** Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) in Niederösterreich. *Zbl. Bakt.*, I, Abt. Orig. 190, 281–298.
- Radda, A., Schmidtke, W., Wandeler, A., 1974.** Nachweis des Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in *Ixodes ricinus* aus dem Kanton Zürich, Schweiz. *Zbl. Bakt.*, Orig. A, 229, 268–272.
- Ragaller, J., 2007.** Persönliche Mitteilung. Allgemeine Verwaltung, Gemeinde Aichavorm Wald.

- Ramelow, C., Süß, J., Berndt, D., Roggendorf, M., Schreier, E., 1993.** Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 45, 115–119.
- Randolph, S. E., 2000.** Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. *Adv. Parasitol.*, 47, 217–243.
- Randolph, S. E., 2002.** Predicting the risk of tick-borne diseases. *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, Suppl. 33, 6–10.
- Randolph, S. E., Green, R. M., Peacey, M. F., Rogers, D. J., 2000.** Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitology*, 121, 15–23.
- Randolph, S. E., Miklisová, D., Lysy, J., Rogers, D. J., Labuda, M., 1999.** Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*, 118, 177–186.
- Rausch, K., 2008.** Persönliche Mitteilung. Gesundheitsamt Amberg-Sulzbach.
- Rehaček, J., 1962.** Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. *Acta. Virol.*, 6, 220–226.
- Rehse-Küpper, B., Danielova, V., Klenk, W., Abar, B., Ackermann, R., 1976.** Epidemiologie der Zentraleuropäischen Enzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland. *Munch. Med. Wochenschr.*, 118, 1615–1616.
- Rehse-Küpper, B., Danielova, V., Klenk, W., Abar, B., Ackermann, R., 1978.** The isolation of central European encephalitis (tick-borne encephalitis) virus from *Ixodes ricinus* (L.) ticks in Southern-Germany. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. A*, 242, 148–155.

- Reiner, B., Fischer, A., 1998.** Frühsommer-Meningoencephalitis (FSME) beim Hund in Deutschland: Zwei Fallberichte. *Kleintierpraxis*, 43, 225–268.
- Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S. C., 1995.** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375, 291–298.
- RKI, 2005.** Risikogebiete der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland. *Epidemiol. Bull.*, 16/2005.
- RKI, 2006.** FSME: Zum aktuellen Vorkommen in Deutschland. *Epidemiol. Bull.*, 17/2006.
- RKI, 2007.** FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epidemiol. Bull.*, 15/2007.
- RKI, 2008.** FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epidemiol. Bull.*, 17/2008.
- Roehrig, J. T., Hunt, A. R., Johnson, A. J., Hawkes, R. A., 1989.** Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley Encephalitis Virus elicit antiviral antibody. *Virology*, 171, 49–60.
- Rufli, T., Mumcuoglu, Y., 1981.** Ixodidae, Schildzecken. Argasidae, Lederzecken. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, 70, 362–385.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., 1977.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463–5467.
- Scheid, W., Ackermann, R., Bloedhorn, H., Löser, R., Liedtke, G., Skrtic, N. 1964.** Untersuchungen über das Vorkommen der Zentraleuropäischen Enzephalitis in Süddeutschland. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 89, 2313–2317.

- Schneider, H., 1931.** Ueber epidemische akute "Meningitis serosa". Wien. Klin. Wochenschr., 44, 350–352.
- Schwaiger, M., Cassinotti, P., 2003.** Development of a quantitative real-time rt-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. J. Clin. Virol., 27, 136–145.
- Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F. T., Pfister, K., 2008.** *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. Emerg. Infect. Dis., 14, 972–974.
- Snow, K. R., 1978.** Larval ticks found on small mammals in Britain. The Mammal Society, Berkshire.
- Sonenshine, D. E., 1991.** Biology of ticks Vol 1. Oxford University Press, New York.
- Sonenshine, D. E., 1993.** Biology of ticks Vol 2. Oxford University Press, New York.
- Süss, J., Beziat, P., Rohr, H. P., Treib, J., Haass, A., 1996.** Detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several federal "Länder" of Germany by means of the polymerase chain reaction (PCR) – characterization of the virus. Infection, 24, 403–404.
- Süss, J., Klaus, C., Diller, R., Schrader, C., Wohanka, N., Abel, U., 2006.** TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. Int. J. Med. Microbiol., 296, 63–68.
- Süss, J., Schrader, C., Falk, U., Wohanka, N., 2004.** Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany – epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. Int. J. Med. Microbiol., 293, Suppl. 37, 69–79.

- Šumilo, D., Asokliene, L., Bormane, A., Vasilenko, V., Golovljova, I., Randolph, S. E., 2007.** Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS ONE*, 2, e500.
- Sumilo, D., Bormane, A., Asokliene, L., Vasilenko, V., Golovljova, I., Avšič-Županc, T., Hubálek, Z., Randolph, S. E., 2008.** Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and eastern Europe. *Rev. Med. Virol.*, 18, 81–95.
- Takashima, I., Morita, K., Chiba, M., Hayasaka, D., Sato, T., Tekezawa, C., Igarashi, A., Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Hashimoto, N., 1997.** A case of tick-borne encephalitis in Japan and isolation of the virus. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 1843–1947.
- Thiel, H.-J., Collett, M. S., Gould, E. A., Heinz, F. X., Houghton, M., Meyers, G., Purcell, R. H., Rice, C. M., 2005.** Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses.* Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (Eds.). 981–998. Elsevier Academic Press.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673–4680.
- Tipold, A., Fatzer, R., Holzmann, H., 1993.** Zentraleuropäische Zeckenzephalitis beim Hund. *Kleintierpraxis*, 38, 615–688.
- Venugopal, K., Gritsun, T., Lashkevich, V. A., Gould, E. A., 1994.** Analysis of the structural protein gene sequence shows Kyasanur Forest Disease Virus as a distinct member in the tick-borne encephalitis virus serocomplex. *J. Gen. Virol.*, 75, 227–232.

- Wallner, G., Mandl, C. W., Ecker, M., Holzmann, H., Stiasny, K., Kunz, C., Heinz, F. X., 1996.** Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.*, 77, 1035–1042.
- Wallner, G., Mandl, C. W., Kunz, C., Heinz, F. X., 1995.** The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, 213, 169–178.
- Wandeler, A., Steck, F., Fankhauser, R., Kammermann, B., Gresíková, M., Blascovic, D., 1972.** Isolierung des Virus der Zentraleuropäischen Zeckenzephalitis in der Schweiz. *Path. Microbiol.*, 38, 258–270.
- Weissenböck, H., 1998.** Postmortale Diagnostik der Frühsommer-Meningo-encephalitis (FSME) beim Hund. *Tierärztl. Umschau*, 54, 249–255.
- Whitby, J. E., Whitby, S. N., Jennings, A. D., Stephenson, J. R., Barrett, A. D., 1993.** Nucleotide sequence of the envelope protein of a Turkish isolate of tick-borne encephalitis (TBE) virus is distinct from other viruses of the TBE virus complex. *J. Gen. Virol.*, 74, 921–924.
- Wilson, M. L., 1994.** Population Ecology of Tick Vectors: Interaction, Measurement, and Analysis. In: *Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses*. Sonenshine, D. E., Mather, T. M. (Eds.). 20–44. Oxford University Press.
- Zahler, M., 1994.** Zur Ökologie von *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Parasitiformes: Ixodida: Ixodidae). [Dissertation] Tierärztliche Fakultät, Universität, München.
- Zahler, M., Steffen, Th., Lutz, S., Hähnel, S.-Ch., Rinder, H., Gothe, R., 2000.** *Babesia canis* und *Dermacentor reiculatus* in München, ein neuer Naturherd in Deutschland. *Tierärztl. Prax.*, 28 (K), 116–120.

Zeman, P., Beneš, C., 2004. A tick-borne encephalitis ceiling in central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? *Int. J. Med. Microbiol.*, 293, Suppl. 37, 48–54.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Entwicklungsstadien von <i>Ixodes ricinus</i>	5
Abb. 2	Entwicklungszyklus von <i>Ixodes ricinus</i>	8
Abb. 3	Übersicht über die Gruppe der durch Zecken übertragenen Flaviviren	15
Abb. 4	Schematische Darstellung eines reifen FSME-Virus	16
Abb. 5	Schematische Darstellung der Genomorganisation und Aufbau des Polyproteins des FSME-Virus	17
Abb. 6	Verbreitungsgebiet des Europäischen und des Fernöstlichen Subtyps der FSME	19
Abb. 7	Übersicht der untersuchten Standorte auf einer FSME-Risikogebietskarte Bayerns von 2006	30
Abb. 8 A, B	Aufnahmen des Standortes München	31
Abb. 9 A, B	Aufnahmen des Standortes Dachau	32
Abb. 10 A, B	Aufnahmen des Standortes Rosenheim	33
Abb. 11 A, B	Aufnahmen des Standortes Amberg	33
Abb. 12 A, B	Aufnahmen des Standortes Passau	34
Abb. 13 A	Zeckensammeln mittels Zeckenfahne	36
Abb. 13 B	Sortieren der Zecken nach Stadium und Geschlecht	36
Abb. 14	Beispielhafte Darstellung eines real-time PCR-Ergebnisses	39
Abb. 15	Verteilung der gesammelten Zecken auf die verschiedenen Stadien nach Standorten	49

Abb. 16	Anzahl gesammelter Zecken pro Sammeltermin	50
Abb. 17	Temperaturverlauf in den Jahren 2006 und 2007 an den verschiedenen Standorten	53
Abb. 18	Variation der Tagesdurchschnittstemperatur an den Wetterstationen in den Jahren 2006 und 2007	53
Abb. 19	Jährliche Niederschlagshöhe an den verschiedenen Standorten in 2006 und 2007	54
Abb. 20	Auftrennung der PCR-Produkte im 1%igen Agarosegel nach Amplifikation der E-Gen-Region	57
Abb. 21	Phylogenetischer Stammbaum (Verfahren: „Distance-Matrix“)	61
Abb. 22	Phylogenetischer Stammbaum (Verfahren: „Maximum-Likelihood“)	62
Abb. 23	Phylogenetischer Stammbaum (Verfahren: „Maximum-Parsimony“)	63
Abb. 24 A-F	Graphische Darstellung der Regressionsanalyse der vor Ort gemessenen Temperatur und der Anzahl gesammelter Zecken je Standort	109
Abb. 25 A-F	Graphische Darstellung der Regressionsanalyse der vor Ort gemessenen relativen Luftfeuchtigkeit und der Anzahl gesammelter Zecken je Standort	112

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der Taxonomie der Zecken in Europa und relevante Gattungen	3
Tab. 2	Auswahl der durch <i>Ixodes ricinus</i> übertragenen Erreger	11
Tab. 3	Kriterien für die Definition der Risikogebiete in Deutschland durch das Robert Koch-Institut	21
Tab. 4	Vergleichende Darstellung von Untersuchungen zur Prävalenz des FSME-Virus in nüchternen <i>Ixodes ricinus</i> -Zecken	28
Tab. 5	Primer und Sonde für den FSME-Nachweis	40
Tab. 6	Reaktionsansatz für den FSME-Nachweis	41
Tab. 7	PCR-Protokoll für den FSME-Nachweis	41
Tab. 8	Primer und Sonde für den Nachweis der 16S rRNA von <i>Ixodes ricinus</i>	42
Tab. 9	Reaktionsansatz für den Nachweis der 16S rRNA von <i>Ixodes ricinus</i>	42
Tab. 10	Primer für die Amplifikation des E-Gens	43
Tab. 11	Reaktionsansatz für die Amplifikation des E-Gens	44
Tab. 12	RT-PCR-Protokoll für die Amplifikation des E-Gens	44
Tab. 13	Korrelation zwischen der Anzahl gesammelter Zecken mit der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit	51
Tab. 14	Übersicht der ermittelten FSME-Prävalenzen nach Standorten und Zeckenstadien	56
Tab. 15	Zuordnung der Proben zu Genotypen nach Sequenzierung	58

Tab. 16	Polymorphe Aminosäurepositionen im Vergleich der bayerischen Genotypen mit dem Stamm Neudoerfl	59
Tab. 17	Übersicht der am Standort München erhobenen Daten	103
Tab. 18	Übersicht der am Standort Dachau erhobenen Daten	104
Tab. 19	Übersicht der am Standort Rosenheim erhobenen Daten	105
Tab. 20	Übersicht der am Standort Amberg erhobenen Daten	106
Tab. 21	Übersicht der am Standort Passau erhobenen Daten	107
Tab. 22	Lage der Stationen des Deutschen Wetterdienstes und ihre Entfernung zum jeweiligen Standort	108
Tab. 23	Anzahl der untersuchten Zecken nach Standorten und Entwicklungsstadien, Übersicht über Anzahl der in Pools homogenisierten Zecken und Anzahl eineln homogenisierter Zecken	108
Tab. 24	Für die phylogenetischen Analysen verwendete Sequenzen	118
Tab. 25	Übereinstimmung der für die Erstellung der Phylogenie verwendeten Sequenzen in Prozent	120

11. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	zirka
CEEV	<i>Central-European-Encephalitis-Virus</i>
CI	<i>confidence interval</i>
cm	Zentimeter
C-Protein	Capsid-Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>dexoxyribonucleic acid</i>)
EDEN	<i>Emerging Diseases in a Changing European Environment</i>
E-Gen	<i>Envelope-Gen</i>
E-Protein	<i>Envelope-Protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FAM	Carboxyfluoreszein
FSME	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis
G	Guanin
GPS	<i>Global Positioning System</i>
HEX	Hexachlorfluoreszein
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
KI	Konfidenzintervall
km	Kilometer
LK	Landkreis
m ü. NN	Meter über Normalnull
m ²	Quadratmeter
min	Minuten

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

MIR	Minimale Infektionsrate
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M-Protein	Membran-Protein
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
NCR	nicht-kodierende Genregion (<i>non-coding region</i>)
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
prM-Protein	<i>precursor of M-Protein</i>
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
real-time RT-PCR	real-time Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RSSEV	<i>Russian-Spring-Summer-Encephalitis-Virus</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
s	Sekunden
s ⁻¹	Hertz
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
TBE	FSME (<i>tick-borne encephalitis</i>)
TBEV	FSME-Virus (<i>tick-borne encephalitis virus</i>)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentralnervöses System

12. Anhang

12.1 Tabellen

Tab. 17: Übersicht der am Standort München erhobenen Daten: tatsächlich beprobte Fläche, Anzahl gesammelter Zecken pro 100 m² und die jeweiligen Witterungsbedingungen. Temperatur und rLF (relative Luftfeuchtigkeit) wurden jeweils am Boden, im Schatten gemessen.

Datum	Fläche in m ²	Anzahl gesammelter Zecken pro 100m ²			Witterungsverhältnisse		
		Larven	Nymphen	Adulte	Temperatur in °C	rLF in %	Bemerkungen
19.04.06	141	0,0	2,1	2,8	18	-	sonnig, trocken
16.05.06	141	1,4	13,5	7,1	18	-	bewölkt, feucht
16.06.06	141	0,0	5,0	8,5	23	-	sonnig, trocken
19.07.06	141	0,0	6,4	3,5	18	-	sonnig, trocken
21.08.06	141	0,0	2,1	1,4	17	-	bewölkt, feucht
18.09.06	141	0,0	2,8	5,7	17	-	bewölkt, trocken
20.10.06	141	10,6	6,4	3,5	12	-	bewölkt, trocken
16.11.06	141	0,0	0,0	1,4	16	-	sonnig, trocken
14.12.06	141	0,0	0,0	0,0	3	-	sonnig, trocken
09.02.07	150	0,0	0,0	0,0	5	-	sonnig, feucht
12.03.07	150	0,0	1,3	4,0	9	-	sonnig, trocken
05.04.07	266	0,0	9,0	5,6	12	-	sonnig, trocken
12.05.07	266	7,9	7,5	4,1	19	60	bewölkt, trocken
11.06.07	150	2,0	4,0	6,7	21	91	bewölkt, trocken
13.07.07	150	0,0	6,7	7,3	17	85	bewölkt, trocken
06.08.07	150	0,7	4,0	5,3	17	93	sonnig, trocken
09.09.07	150	0,0	1,3	1,3	14	98	bewölkt, feucht
09.10.07	150	0,0	2,0	2,7	12	94	sonnig, trocken
13.11.07	150	0,0	0,0	0,0	4	89	bewölkt, windig
14.12.07	150	0,0	0,0	0,0	1	90	bewölkt, trocken

**Tab. 18: Übersicht der am Standort Dachau erhobenen Daten,
Erläuterungen siehe Tab. 17.**

Datum	Fläche in m ²	Anzahl gesammelter Zecken pro 100m ²			Witterungsverhältnisse		
		Larven	Nymphen	Adulte	Temperatur in °C	rLF in %	Bemerkungen
24.04.06	141	0,0	5,7	4,3	15	-	sonnig, feucht
22.05.06	141	5,7	19,9	2,8	19	-	sonnig, feucht
26.06.06	141	8,5	24,1	1,4	20	-	sonnig, feucht
24.07.06	141	1,4	5,7	0,0	26	-	sonnig, trocken
25.08.06	141	0,7	9,2	2,1	14	-	windig, feucht
25.09.06	282	0,0	5,0	0,7	20	-	sonnig, trocken
22.10.06	212	2,4	5,7	0,5	16	-	sonnig, trocken
14.11.06	141	0,0	0,7	0,0	12	-	bewölkt, feucht
16.02.07	300	0,0	0,0	0,0	7	-	sonnig, trocken
19.03.07	300	0,0	7,3	1,0	6	-	bewölkt, feucht
18.04.07	266	0,4	16,2	2,2	12	-	bewölkt, trocken
22.05.07	150	6,7	45,3	1,3	20	75	bewölkt, feucht
20.06.07	150	2,0	14,0	2,0	22	75	sonnig, trocken
20.07.07	150	0,7	16,7	0,0	25	80	sonnig, feucht
20.08.07	150	8,0	22,0	0,0	16	99	bewölkt, trocken
23.09.07	150	0,0	9,3	0,7	20	85	sonnig, trocken
18.10.07	150	0,7	1,3	0,0	7	99	bewölkt, feucht
13.11.07	150	0,0	0,0	0,0	3	91	bewölkt, feucht
11.12.07	150	0,0	0,0	0,0	1	99	bewölkt, nass

Tab. 19: Übersicht der am Standort Rosenheim erhobenen Daten, Erläuterungen siehe Tab. 17.

Datum	Fläche in m ²	Anzahl gesammelter Zecken pro 100m ²			Witterungsverhältnisse		
		Larven	Nymphen	Adulte	Temperatur in °C	rLF in %	Bemerkungen
08.05.06	141	101,4	17,0	5,7	16	-	sonnig, trocken
09.06.06	141	53,2	11,3	4,3	15	-	sonnig, trocken
10.07.06	141	1,4	7,8	3,5	20	-	bewölkt, feucht
14.08.06	141	0,0	5,0	0,0	-	-	bewölkt, feucht
15.09.06	141	142,6	6,4	1,4	18	-	bewölkt, trocken
13.10.06	705	3,8	2,6	1,7	11	-	sonnig, trocken
11.11.06	141	0,0	0,7	0,0	3	-	sonnig, trocken
10.02.07	150	0,0	0,0	1,3	3	-	sonnig, trocken
12.03.07	150	0,0	4,7	0,0	5	-	sonnig, trocken
05.04.07	300	2,3	25,5	6,0	5	-	sonnig, trocken
11.05.07	133	182,5	48,1	9,8	19	63	sonnig, trocken
14.06.07	150	81,3	50,0	2,7	19	80	sonnig, trocken
15.07.07	150	30,0	34,7	0,7	22	78	sonnig, trocken
12.08.07	150	42,0	6,7	0,0	18	97	bewölkt, feucht
10.09.07	150	15,3	9,3	0,0	13	98	bewölkt, trocken
08.10.07	150	0,7	4,7	0,7	8	99	sonnig, trocken
19.11.07	150	0,0	0,0	0,0	1	99	bewölkt, feucht
14.12.07	150	0,0	0,0	0,0	-1	99	bewölkt, feucht

**Tab. 20: Übersicht der am Standort Amberg erhobenen Daten,
Erläuterungen siehe Tab. 17.**

Datum	Fläche in m ²	Anzahl gesammelter Zecken pro 100m ²			Witterungsverhältnisse		
		Larven	Nymphen	Adulte	Temperatur in °C	rLF in %	Bemerkungen
02.05.06	141	10,6	20,6	7,1	14	-	sonnig, trocken
03.06.06	141	283,7	19,9	3,5	14	-	sonnig, trocken
30.06.06	141	8,5	4,3	12,1	25	-	bewölkt, feucht
29.07.06	141	0,0	7,1	1,4	30	-	sonnig, trocken
01.09.06	141	14,9	12,8	16,3	18	-	bewölkt, trocken
05.10.06	423	9,2	10,4	5,2	11	-	nebelig, feucht
06.11.06	141	0,0	0,7	0,0	9	-	bewölkt, feucht
16.02.07	300	0,0	0,3	0,7	1	-	sonnig, feucht
26.03.07	150	0,0	11,3	6,7	12	-	sonnig, feucht
17.04.07	266	26,3	42,5	7,5	16	-	sonnig, trocken
24.05.07	150	100,7	57,3	9,3	24	60	sonnig, trocken
25.06.07	150	16,0	18,7	2,0	18	91	sonnig, feucht
23.07.07	150	5,3	10,7	5,3	16	95	sonnig, feucht
24.08.07	150	5,3	8,7	2,7	18	99	sonnig, feucht
17.09.07	150	9,3	18,0	3,3	15	99	sonnig, feucht
16.10.07	150	4,0	9,3	2,0	9	99	nebelig, feucht
21.11.07	150	0,0	0,0	0,0	1	98	bewölkt, feucht
11.12.07	150	0,0	0,0	0,0	4	99	bewölkt, nass

**Tab. 21: Übersicht der am Standort Passau erhobenen Daten,
Erläuterungen siehe Tab. 17.**

Datum	Fläche in m ²	Anzahl gesammelter Zecken pro 100m ²			Witterungsverhältnisse		
		Larven	Nymphen	Adulte	Temperatur in °C	rLF in %	Bemerkungen
05.05.06	141	16,3	34,0	5,0	18	-	sonnig, trocken
06.06.06	141	219,9	94,3	13,5	10	-	bewölkt, feucht
05.07.06	141	81,6	59,6	14,2	20	-	sonnig, trocken
07.08.06	141	5,7	34,0	2,1	15	-	bewölkt, feucht
07.09.06	141	7,8	27,0	2,1	20	-	sonnig, trocken
09.10.06	564	5,7	21,1	5,3	9	-	sonnig, trocken
07.11.06	282	0,0	2,8	1,4	4	-	nebelig, feucht
04.12.06	141	0,0	0,0	0,7	12	-	bewölkt, nass
14.02.07	150	0,0	1,3	1,3	5	-	sonnig, feucht
14.03.07	300	1,7	55,0	2,7	11	-	sonnig, trocken
10.04.07	266	29,3	68,7	8,3	15	-	sonnig, trocken
18.05.07	150	386,7	84,7	4,7	10	90	bewölkt, nass
15.06.07	150	402,0	76,7	7,3	19	78	sonnig, trocken
17.07.07	150	38,0	46,7	2,7	24	65	sonnig, trocken
13.08.07	150	25,3	31,3	1,3	18	99	bewölkt, trocken
14.09.07	150	49,3	70,0	3,3	13	94	sonnig, trocken
11.10.07	150	6,7	49,3	0,7	10	96	bewölkt, trocken
22.11.07	150	0,0	0,0	0,0	0	99	nebelig, Schnee
10.12.07	150	0,0	0,0	0,0	3	99	nebelig, nass

Tab. 22: Lage der Stationen des Deutschen Wetterdienstes und ihre Entfernung zum jeweiligen Standort.

Standort	Stationsnummer des DWD*	Lage	Entfernung zum Standort in km
München	KL 4124	N48°10' / E11°33'	7,0
Dachau	KL 4116	N48°24' / E11°19'	11,0
Rosenheim	KL 4544	N47°53' / E12°08'	4,5
Amberg	KL 4075	N49°28' / E11°51'	5,3
Passau	KL 4512	N48°47' / E13°19'	12,9

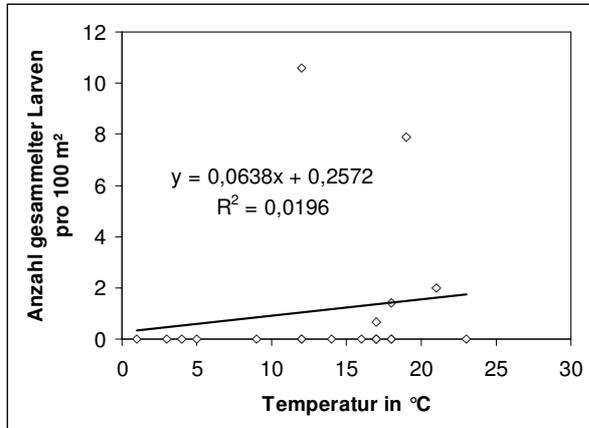
*DWD: Deutscher Wetterdienst

Tab. 23: Anzahl der untersuchten Zecken nach Standorten und Entwicklungsstadien, Übersicht über Anzahl der in 5er Pools homogenisierten Zecken und Anzahl der Zecken, die vor Poolbildung einzeln homogenisiert wurden.

Standort	Homogenisierung in 5er Pools		einzelne Homogenisierung vor Bildung von 5er Pools	
	Adulte gesamt (weiblich / männlich)	Nymphen	Adulte gesamt (weiblich / männlich)	Nymphen
München	205 (55 / 150)	240	100 (75 / 25)	100
Dachau	200 (45 / 155)	240	100 (100 / 0)	100
Rosenheim	80 (20 / 60)	235	155 (90 / 65)	100
Amberg	215 (85 / 130)	235	105 (105 / 0)	100
Passau	170 (35 / 135)	415	135 (135 / 0)	200

12.2 Regressionsanalysen

A: München



B: Dachau

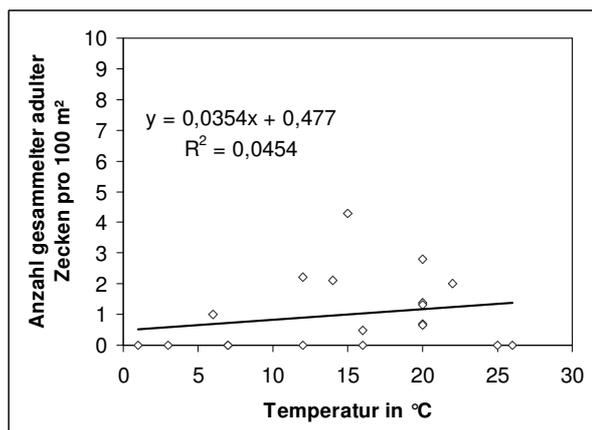
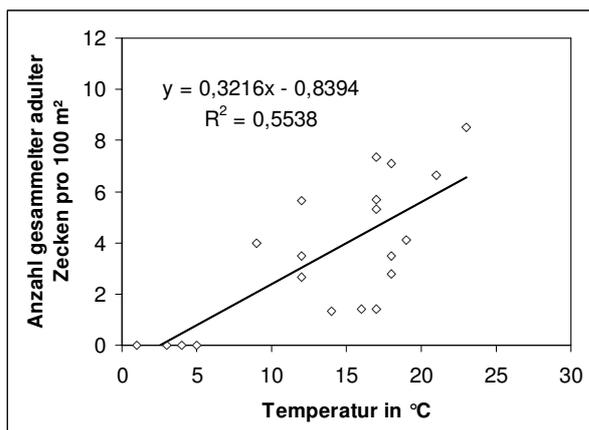
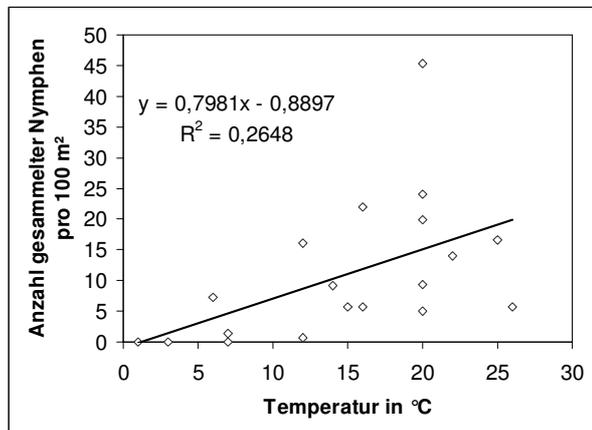
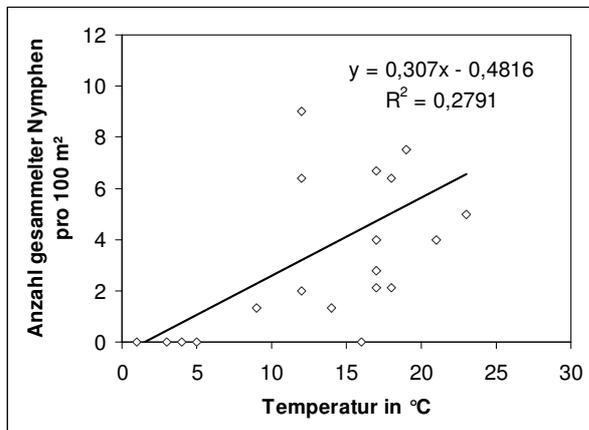
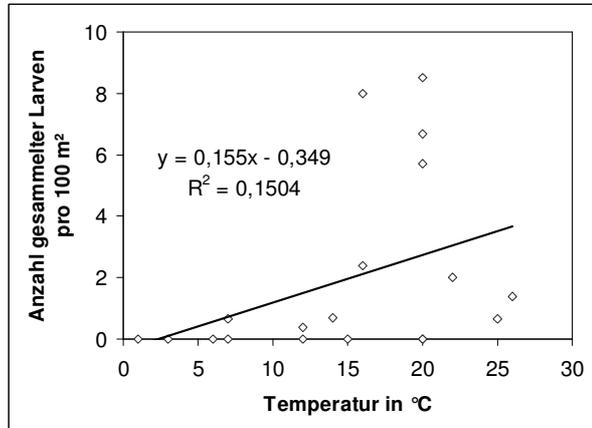
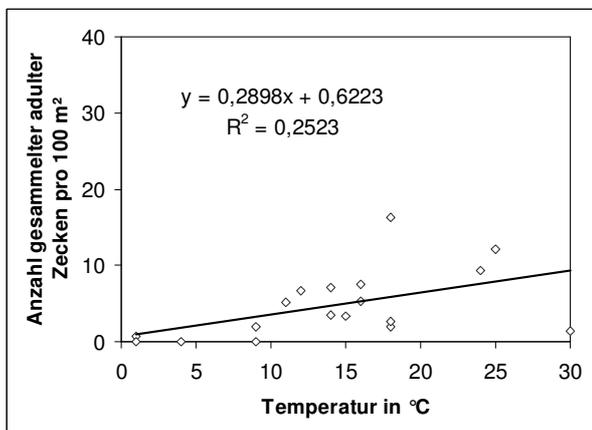
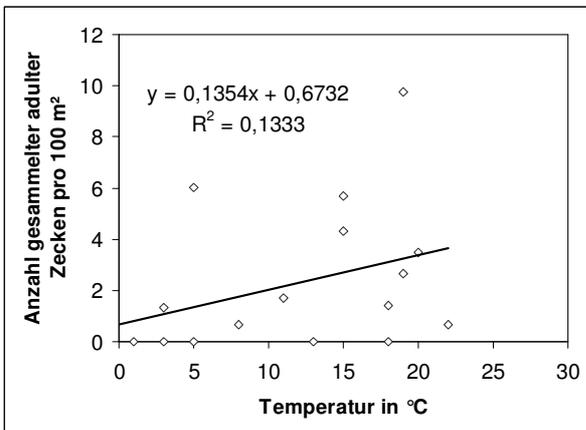
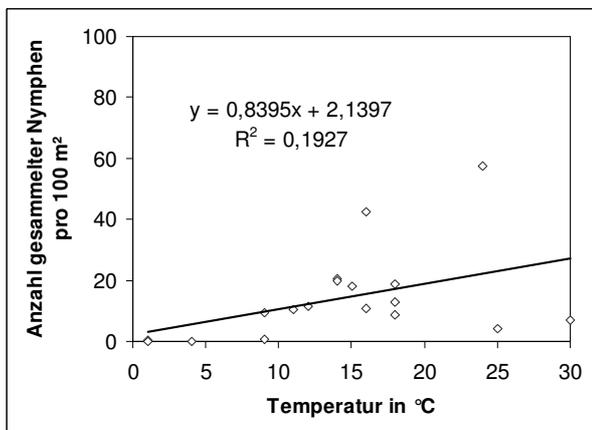
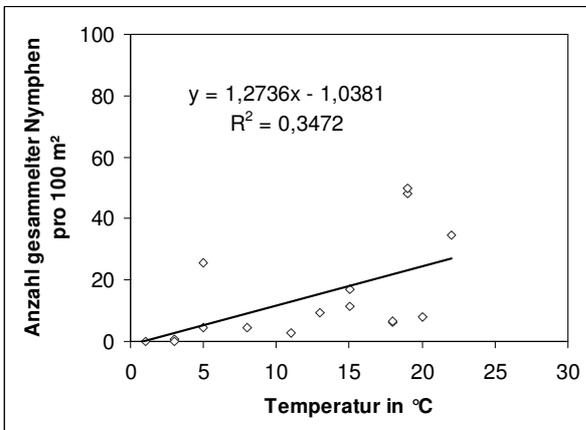
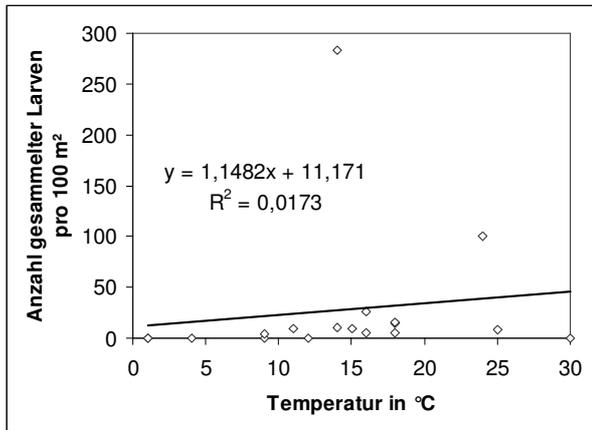
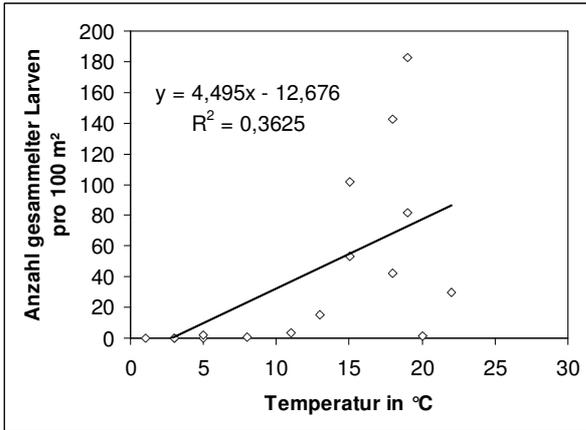


Abb. 24 A - F: Anzahl gesammelter Zecken pro 100 m² je Standort in Abhängigkeit von der vor Ort gemessenen Temperatur. Mittels Regressionsanalyse wurde die beobachtete Beziehung als Funktion beschrieben und graphisch dargestellt. Angegeben sind die Funktionsgleichung und das Bestimmtheitsmaß R^2 .

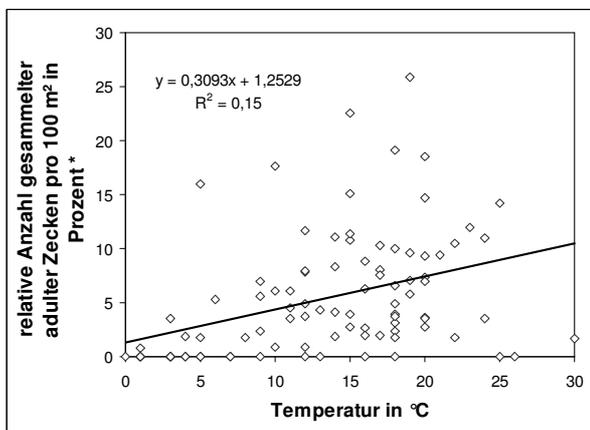
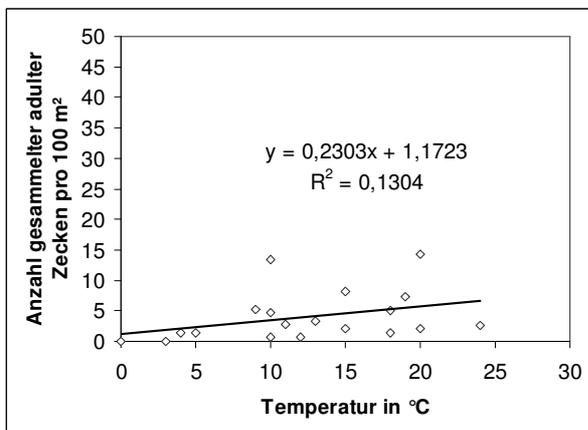
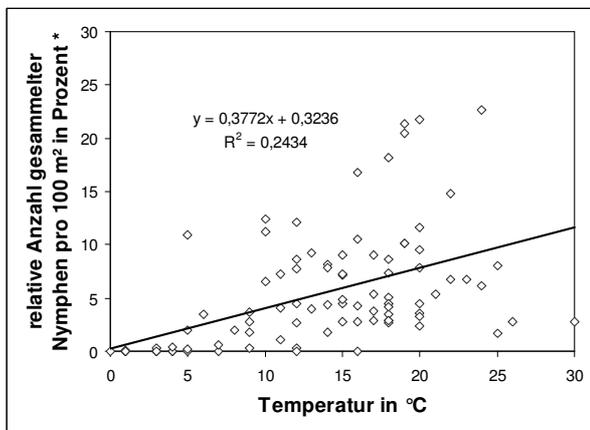
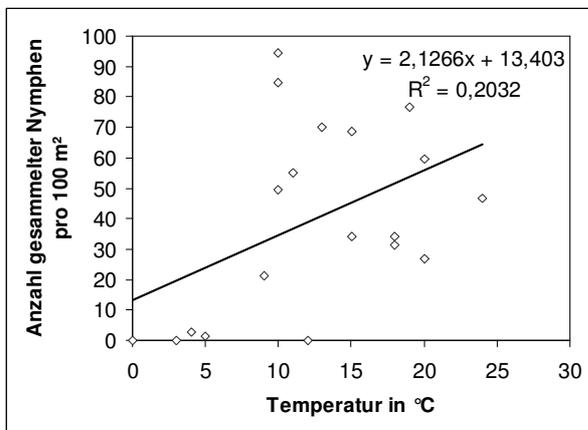
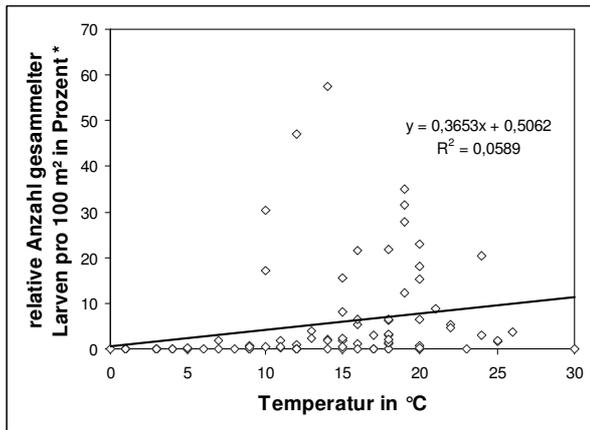
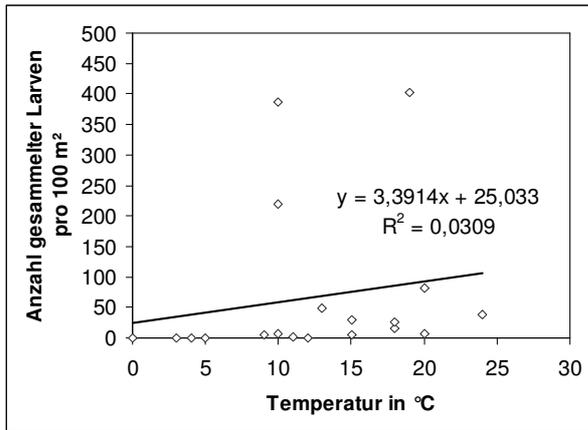
C: Rosenheim

D: Amberg



E: Passau

F: alle Standorte



* bezogen auf 100 % = maximal gesammelte Zeckenanzahl pro 100 m²

A: München

B: Dachau

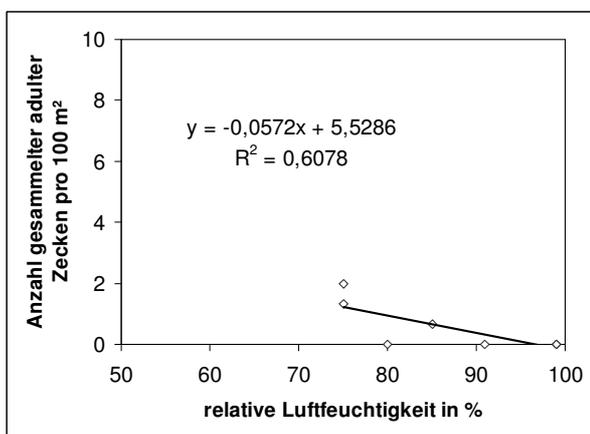
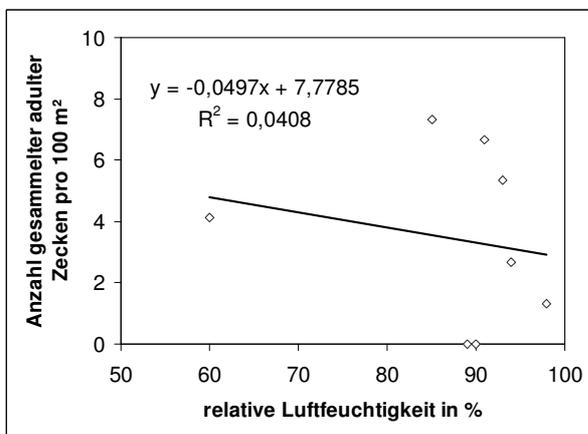
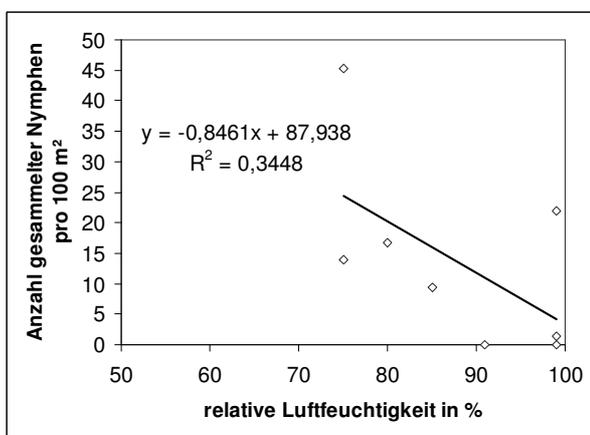
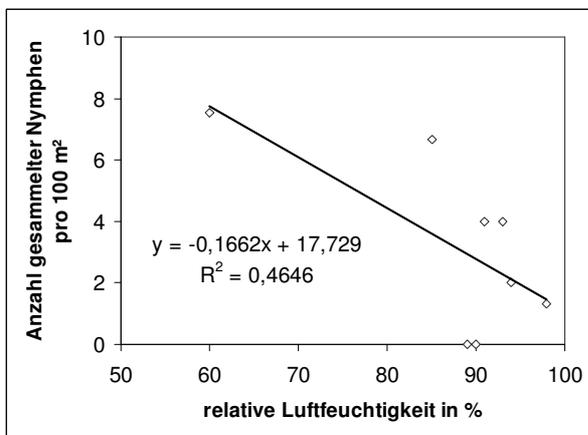
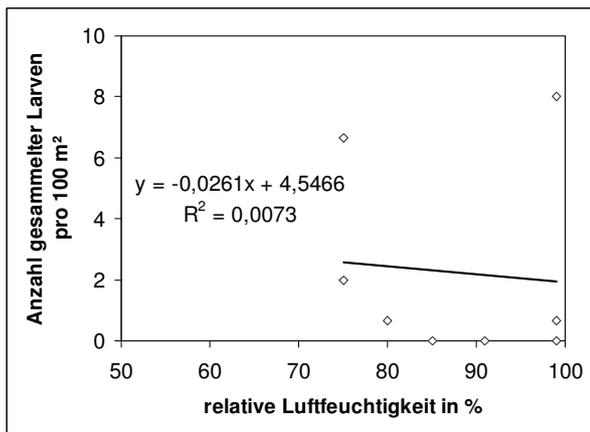
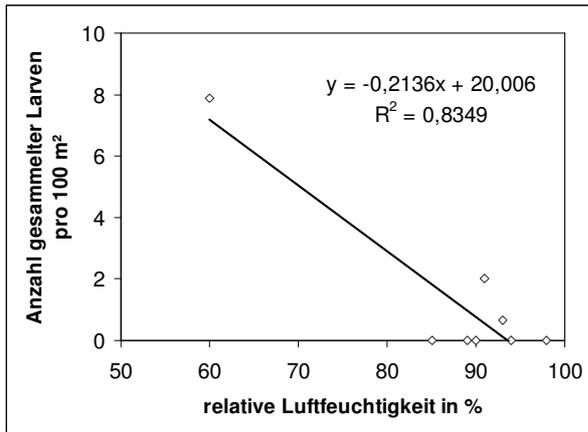
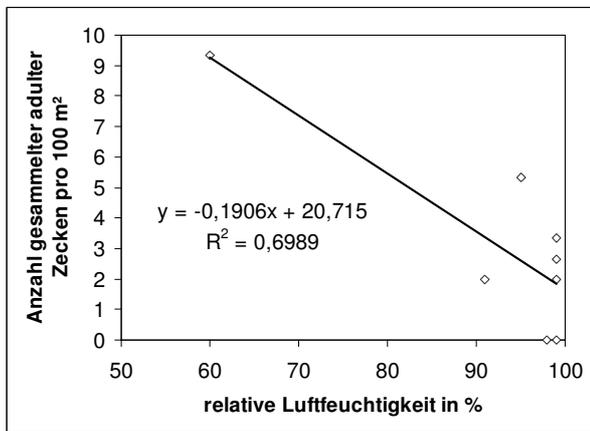
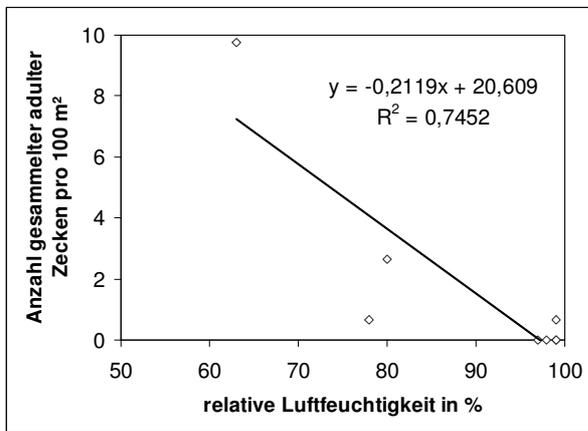
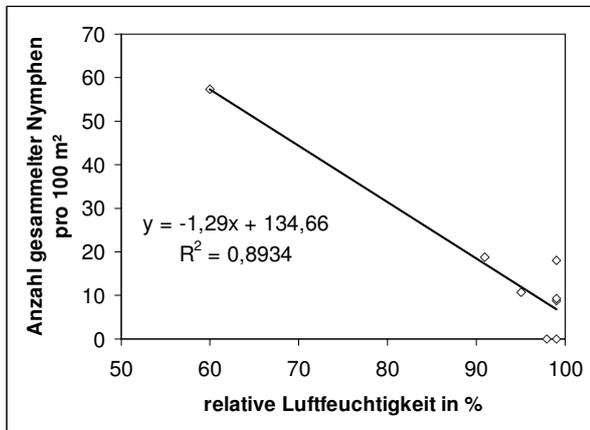
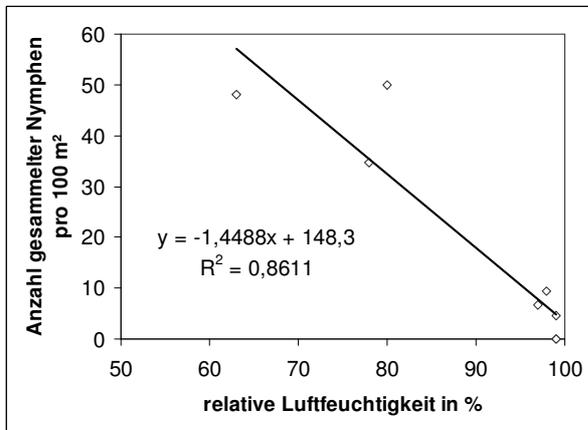
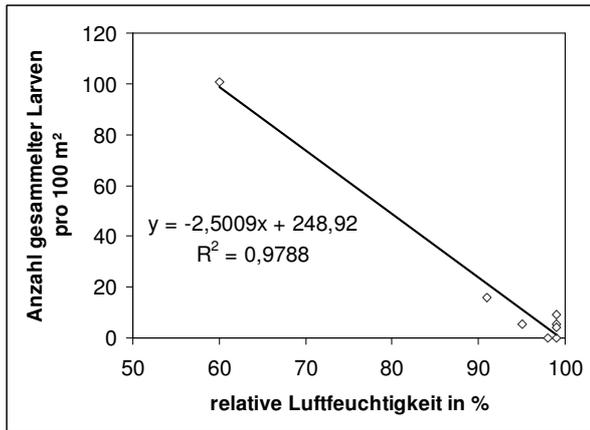
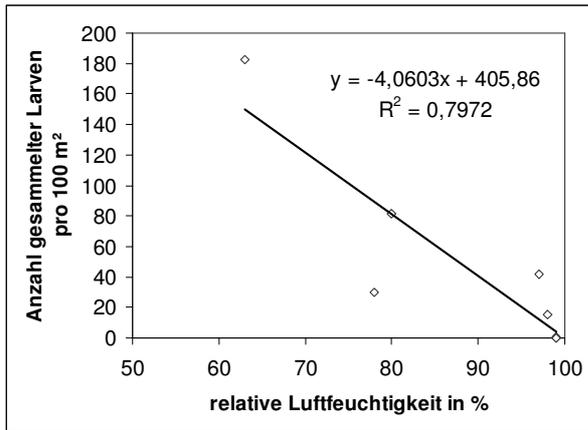


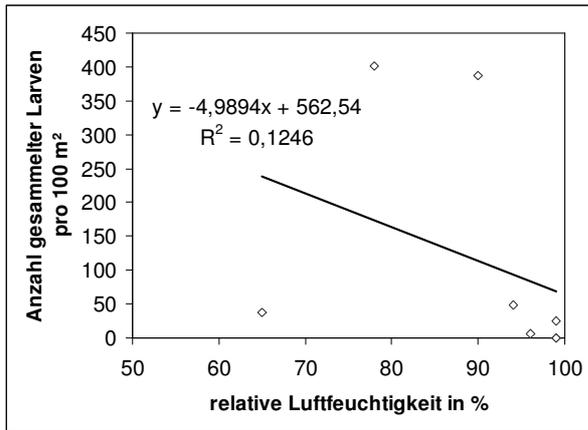
Abb. 25 A - F: Anzahl gesammelter Zecken pro 100 m² je Standort in Abhängigkeit von der vor Ort gemessenen relativen Luftfeuchtigkeit. Mittels Regressionsanalyse wurde die beobachtete Beziehung in einer Funktion beschrieben und graphisch dargestellt. Angegeben sind die Funktionsgleichung und das Bestimmtheitsmaß R².

C: Rosenheim

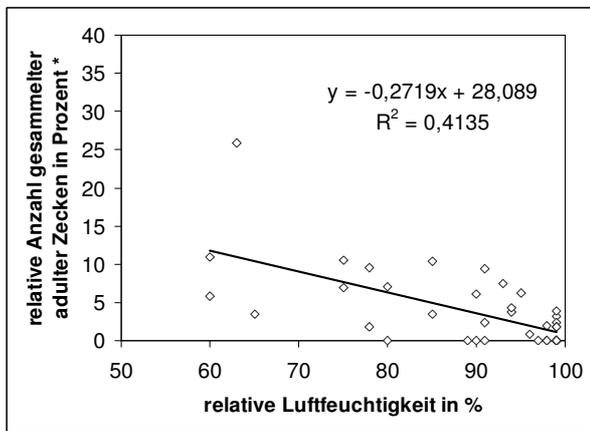
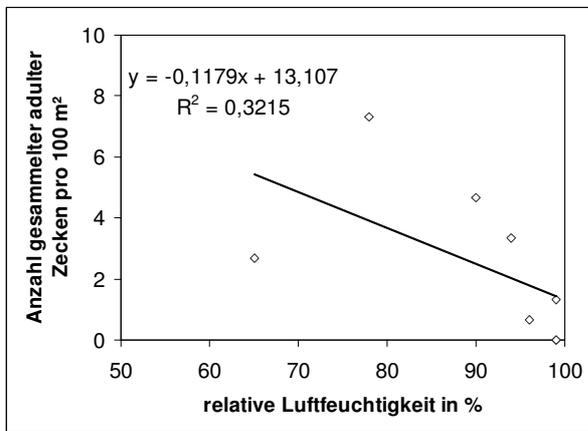
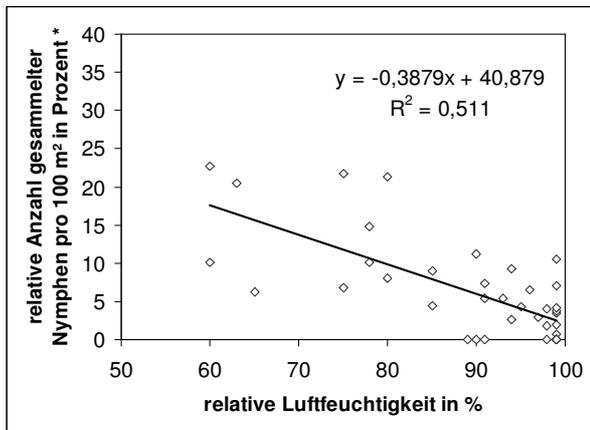
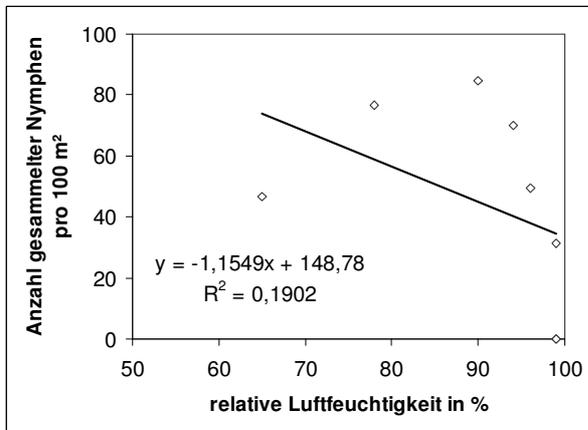
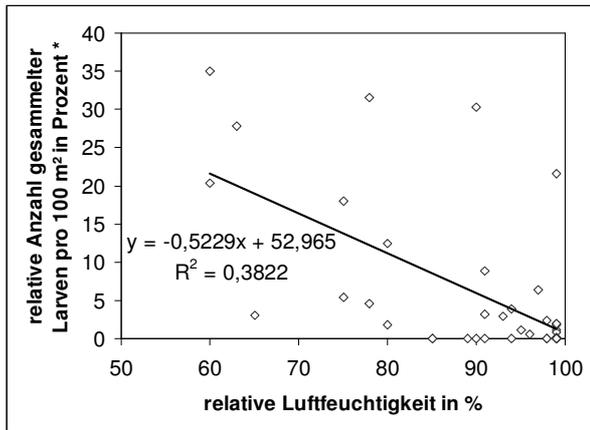
D: Amberg



E: Passau



F: alle Standorte



* bezogen auf 100 % = maximal gesammelte Zeckenanzahl pro 100 m²

12.3 Sequenzanalysen

Alignment der in dieser Studie erhaltenen Nukleotid-Sequenzen und der entsprechenden Sequenz des Stammes Neudoerfl:

RO I	Standort Rosenheim (Genbanknummer: FJ360850)
AM I	Standort Amberg (Genbanknummer: FJ360845)
AM II	Standort Amberg (Genbanknummer: FJ360846)
PA I	Standort Passau (Genbanknummer: FJ360847)
PA II	Standort Passau (Genbanknummer: FJ360848)
PA III	Standort Passau (Genbanknummer: FJ360849)
Neudoerfl	Prototyp des Europäischen FSME-Subtyp (Genbanknummer: M27157)

RO_I	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCCGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
AM_I	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCTGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
AM_II	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCTGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
PA_I	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCCGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
PA_II	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCCGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
PA_III	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCCGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80
NEUDOERFL	TACGAGGGTCACCTTGGTGTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACATAACAGCTGAGGGCAAGCCTTCAATGGATGTGTGGC	80

RO_I	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
AM_I	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
AM_II	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
PA_I	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
PA_II	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
PA_III	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160
NEUDOERFL	TTGACGCCATTTACCAGGATACCCTGTGAAGACAGCTGAGTACTGTTTACACGCCAAGTTGTCGGACACTAAGGTTGCA	160

RO_I	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCACCTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
AM_I	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCATTTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
AM_II	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCATTTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
PA_I	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCACCTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
PA_II	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCACCTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
PA_III	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCACCTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240
NEUDOERFL	GCCAGATGCCAACCATGGGACCAGCCACCTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCACAGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGA	240

RO_I	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
AM_I	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
AM_II	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
PA_I	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
PA_II	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
PA_III	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320
NEUDOERFL	TGCAGGCTGGGGCAACCCTGTGGACTGTTTGGAAAGGGTAGCATTTGTGGCTTGTGTAAGGCGGCTTGTGAGGCAAAAA	320

RO_I	AGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
AM_I	AGAAAGCCATAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
AM_II	AGAAAGCCATAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
PA_I	AGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
PA_II	AGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
PA_III	AGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400
NEUDOERFL	AGAAAGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGAACCACACACGGGAGACTATGTT	400

Anhang

RO_I	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
AM_I	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
AM_II	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
PA_I	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
PA_II	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
PA_III	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
NEUDOERFL	GCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGACGGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAAAACACCATTCTGACTATGGGTGA	480
RO_I	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
AM_I	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
AM_II	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
PA_I	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
PA_II	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
PA_III	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
NEUDOERFL	GTATGGAGATGTGCTTTGTTGTGCAGAGTCGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCAGACCCGTATCCTTGAGCTTGACAAGA	560
RO_I	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
AM_I	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
AM_II	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
PA_I	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
PA_II	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
PA_III	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
NEUDOERFL	CAGTGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGGGATTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCATGGAAACATGAGGGA	640
RO_I	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
AM_I	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
AM_II	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
PA_I	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
PA_II	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
PA_III	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
NEUDOERFL	GCGCAAAACTGGAAACAACGCCGAGAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACGTGTACAACCTCGG	720
RO_I	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
AM_I	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
AM_II	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
PA_I	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
PA_II	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
PA_III	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
NEUDOERFL	AGACCAGACTGGAGTGTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCCTGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGA	800
RO_I	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
AM_I	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
AM_II	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
PA_I	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
PA_II	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
PA_III	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
NEUDOERFL	GTGGCCATGTGACCTGCGAAGTGGGACTGGAAAACTGAAGATGAAAGCCCTCACGTACACAATGTGTGACAAAACAAAG	880
RO_I	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
AM_I	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
AM_II	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
PA_I	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
PA_II	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
PA_III	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
NEUDOERFL	TTTACATGGAAGAGAGCTCCAACAGACAGTGGGCACGATACAGTGGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTG	960
RO_I	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
AM_I	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
AM_II	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
PA_I	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
PA_II	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
PA_III	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
NEUDOERFL	TAGGATCCAGTCAGGGCAGTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCATGCTGATAACGCCAAACCCAACAATTG	1040
RO_I	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
AM_I	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
AM_II	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
PA_I	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
PA_II	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
PA_III	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120
NEUDOERFL	AAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGATAACATATCTATGTGGGGACTGAGTCATCAA	1120

Anhang

RO_I	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
AM_I	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
AM_II	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
PA_I	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
PA_II	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
PA_III	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
NEUDOERFL	TGGTTCCAAAAGGGGAGCAGCATCGGAAGGTTTCCAAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTCATAGGAGA	1200
RO_I	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
AM_I	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
AM_II	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
PA_I	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
PA_II	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
PA_III	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
NEUDOERFL	GCACGCCTGGGACTTCGGTCTGCTGGAGGCTTCTGAGTCAATTGGGAAGGCGGTCCACACGGTCTTGGTGGTGCCT	1280
RO_I	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
AM_I	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
AM_II	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
PA_I	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
PA_II	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
PA_III	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
NEUDOERFL	TCAAAGCATCTTCGGGGGAGTGGGGTTTCTACCAAACTTTTATTAGGAGTGGCATTGGCTTGGTTGGGCCTGAACATG	1360
RO_I	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
AM_I	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
AM_II	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
PA_I	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
PA_II	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
PA_III	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434
NEUDOERFL	AGAAACCTACAATGTCCATGAGCTTCTCTTGGCTGGAGGCTGGTCTTGGCCATGACCCCTGGAGTGGGGGC	1434

Tab. 24: Für die phylogenetischen Analysen verwendete Sequenzen. Die Zahlen 1 bis 28 entsprechen den in Tab. 25 anstelle der Sequenznamen verwendeten Nummern.

	Stamm	geographische Herkunft	Jahr der Erstbeschreibung	Quelle	Genbanknummer
1	A 52	Kumlinge, Finnland	1952	Whitby <i>et al.</i> (1993)	X60286
2	Absettarov	Region St. Petersburg, Russland	1951	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091005
3	Aina	Irkutsk, Russland	1963	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091006
4	Als I	Elsass, Frankreich	1975	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091007
5	AM I	LK Amberg-Sulzbach, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360845
6	AM II	LK Amberg-Sulzbach, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360846
7	Crimea	Krim, Ukraine	1987	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091008
8	Hypr	Brno, Tschechien	1953	Wallner <i>et al.</i> (1995)	U39292
9	K23	Karlsruhe, Deutschland	1975	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091010
10	Kyasanur Forest Disease Virus (KFDV)	Ulvi, Indien	1957	Venugopal <i>et al.</i> (1994)	X74111.1
11	Langat Virus (Stamm TP21)	Malaysia	1956	Campbell und Pletnev (2000)	AF253419
12	Ljubljana I	Ljubljana, Slowenien	1993	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091012
13	Louping ill Virus	Grossbritannien	unbekannt	Gritsun <i>et al.</i> (1997)	Y07863.1
14	N256	Minsk, Weißrussland	unbekannt	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091014
15	Neudoerfl	Neudoerfl, Österreich	1971	Mandl <i>et al.</i> (1988)	M27157
16	Omsk Hemorrhagic Fever Virus (OHF)	Omsk, Russland	1947	Gritsun <i>et al.</i> (1993b)	X66694.1

Anhang

17	Oshima	Hokkaido, Japan	1993	Takashima <i>et al.</i> (1997)	AB001026
18	PA I	LK Passau, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360847
19	PA II	LK Passau, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360848
20	PA III	LK Passau, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360849
21	Pan	Moskau, Russland	1957	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091015
22	Powassan Virus	Ontario, Kanada	1958	Mandl <i>et al.</i> (1993)	L06436
23	RK1424	Lettland	1977	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091016
24	RO I	LK Rosenheim, Deutschland	2006	eigene Untersuchungen	FJ360850
25	Sofijn	Primorskii Kray, Russland	1937	Pletnev <i>et al.</i> (1990)	X07755
26	St. Ves	Stara Ves, Kroatien	unbekannt	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091018
27	T-blood	Perm, Russland	1939	Ecker <i>et al.</i> (1999)	AF091019
28	Vasilchenko	Novosibirsk, Russland	1969	Gritsun <i>et al.</i> (1993a)	M97369

Erläuterungen zu Tab. 25 (folgende Seite):

Werte oberhalb der Diagonalen entsprechen dem Grad der Übereinstimmung auf Nukleotidebene, Werte unterhalb der Diagonalen entsprechen dem Grad der Übereinstimmung auf Aminosäureebene (alle Angaben in Prozent). Die anstelle der Sequenznamen verwendeten Nummern (1 bis 28) sind in Tab. 24 erläutert.

Tab. 25: Übereinstimmung der für die Erstellung der Phylogenie verwendeten Sequenzen in Prozent, Erläuterungen siehe vorhergehende Seite.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1		100,0	96,2	99,4	99,4	99,4	95,8	99,0	99,6	81,2	87,4	99,6	93,7	100,0	99,8	93,1	95,8	99,8	100,0	99,8	99,4	77,8	94,8	99,8	95,6	98,7	95,8	96,2
2			96,2	99,4	99,4	99,4	95,8	99,0	99,6	81,2	87,4	99,6	93,7	100,0	99,8	93,1	95,8	99,8	100,0	99,8	99,4	77,8	94,8	99,8	95,6	98,7	95,8	96,2
3				95,6	95,6	95,6	97,1	95,6	95,8	81,6	87,9	96,0	92,3	96,2	96,0	92,7	97,1	96,0	96,2	96,0	96,0	78,0	96,0	96,0	96,0	95,6	97,1	100,0
4					99,2	99,2	95,2	98,3	99,0	81,0	87,2	99,4	93,7	99,4	99,2	92,9	95,2	99,6	99,4	99,6	99,6	77,6	94,1	99,6	95,0	98,1	95,2	95,6
5						100,0	95,2	98,3	99,0	80,5	86,8	99,0	93,3	99,4	99,2	92,5	95,2	99,2	99,4	99,2	99,2	77,4	94,1	99,2	95,0	98,1	95,2	95,6
6							95,2	98,3	99,0	80,5	86,8	99,0	93,3	99,4	99,2	92,5	95,2	99,2	99,4	99,2	99,2	77,4	94,1	99,2	95,0	98,1	95,2	95,6
7								95,2	95,4	81,0	88,3	95,4	91,0	95,8	95,6	93,9	99,2	95,6	95,8	95,6	95,6	77,8	98,1	95,6	99,0	95,2	99,0	97,1
8									98,5	80,5	87,2	98,5	92,9	99,0	98,7	92,7	95,2	98,7	99,0	98,7	98,3	77,6	94,1	98,7	95,0	97,7	95,2	95,6
9										81,0	87,2	99,2	93,7	99,6	99,4	92,9	95,4	99,4	99,6	99,4	99,0	77,6	94,4	99,4	95,2	98,3	95,4	95,8
10											79,9	81,0	79,3	81,2	81,2	80,5	81,2	81,0	81,2	81,0	81,4	77,0	80,5	81,0	80,5	81,4	81,0	81,6
11												87,7	84,5	87,4	87,2	86,6	88,5	87,7	87,4	87,7	87,7	77,6	87,2	87,7	87,9	87,2	88,5	87,9
12													93,9	99,6	99,4	92,9	95,4	99,8	99,6	99,8	99,0	78,0	94,4	99,8	95,2	98,3	95,4	96,0
13														93,7	93,5	89,3	91,0	93,9	93,7	93,9	93,5	76,2	90,2	93,9	90,8	92,9	91,4	92,3
14															99,8	93,1	95,8	99,8	100,0	99,8	99,4	77,8	94,8	99,8	95,6	98,7	95,8	96,2
15																92,9	95,6	99,6	99,8	99,6	99,2	77,6	94,6	99,6	95,4	98,5	95,6	96,0
16																	93,7	92,9	93,1	92,9	92,9	77,0	93,1	93,9	93,5	92,5	93,9	92,7
17																		95,6	95,8	95,6	96,0	77,6	98,1	95,6	99,0	95,2	99,0	97,1
18																			99,8	100,0	99,2	78,0	94,6	100,0	95,4	98,5	95,6	96,0
19																				99,8	99,4	77,8	94,8	99,8	95,6	98,7	95,8	96,2
20																				99,3	99,3	78,0	94,6	100,0	95,4	98,5	95,6	96,0
21																				94,3	94,1	77,6	94,6	99,2	95,4	98,5	95,6	96,0
22																					70,1	77,0	78,0	77,4	77,4	77,8	78,0	78,0
23																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	96,0	96,0
24																						69,1	82,6	95,4	98,5	95,6	96,0	96,0
25																						77,6	94,6	99,2	95,4	98,5	95,6	96,0
26																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
27																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
28																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
1																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
2																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
3																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
4																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
5																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
6																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
7																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
8																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
9																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
10																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
11																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
12																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
13																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
14																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
15																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
16																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
17																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
18																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
19																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
20																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
21																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
22																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
23																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
24																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
25																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
26																						70,1	77,0	78,0	77,4	77,8	78,0	78,0
27																						69,6	94,6	98,7	94,6	98,5	95,6	96,0
28																						77,6	94,6	98,7	94,6	98,5		

13. Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Monika Rinder für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für ihre Ratschläge in allen Phasen der Arbeit bedanken. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und die vielen aufmunternden Worte weiß ich sehr zu schätzen.

Bei Dr. Philippe de Mendonça bedanke ich mich für die Betreuung des praktischen Teils der Dissertation und die Einführung in die Methodik der botanischen Bestimmung.

Bei Prof. Pfister möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken diese Dissertation am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie durchzuführen sowie für die Erfahrungen, die ich als Hilfskraft auch in anderen Bereichen der Parasitologie sammeln konnte.

Allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich ein herzliches Dankeschön aussprechen für all die Unterstützung, die ich erfahren habe, für die lieben Worte und das freundschaftliche Miteinander.

Herrn Dr. Dobler und seinen Kollegen möchte ich herzlich für die Möglichkeit danken die Sequenzierung der Virus-positiven Proben in den Labors des Mikrobiologischen Instituts der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München durchzuführen. Frau Zöller danke ich für die freundliche Anleitung bei der Durchführung meiner ersten Sequenzierungen.

Prof. El-Matbouli und den Mitarbeitern des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten danke ich für die gute Zusammenarbeit während der gemeinsamen Nutzung der Laborräume sowie für viele hilfreiche Ratschläge und nette Gespräche.

Sowohl den Institutionen, die für die in dieser Arbeit beprobten Standorte zuständig sind, als auch den privaten Landbesitzern sei herzlich gedankt. Ohne ihre Zustimmung wären die Untersuchungen vielerorts nicht möglich gewesen.

Prof. Avšič-Županc, Nataša Knap und Emina Durmiši aus dem Institute of Microbiology and Immunology in Ljubljana möchte ich danken für das Überlassen der RNA, die im FSME-Nachweis als Positivkontrolle diente, und für die Schulung in den molekularbiologischen Methoden, die für diesen Nachweis verwendet wurden.

Für die finanzielle Unterstützung durch das EDEN-Projekt und für die Möglichkeit innerhalb des Projektes internationale Kontakte zu knüpfen bin ich sehr dankbar.

Johanna Raczynski hat im Jahr 2006 gemeinsam mit mir Zecken gesammelt. Für ihre Unterstützung und den Spaß während der gemeinsamen Fahrten sei ihr herzlich gedankt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Sarah Pfalzer für ihre engagierte Hilfe beim Sammeln, Bestimmen und der Untersuchung der Zecken im Labor.

Cornelia Silaghi und Inga Wichardt haben viel Zeit in das Lesen des Manuskriptes investiert und mir mit wertvollen Verbesserungen und Anregungen sehr geholfen. Auch Bettina Neu möchte ich für ihre spontane Hilfsbereitschaft und Korrekturen herzlich danken.

All meinen Freunden, die während dieser Zeit wenig von mir gehört und gesehen haben, danke ich für ihr Verständnis.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Artur und meiner Familie. Sie haben alle Höhen und Tiefen mit mir erlebt, mich immer unterstützt und hinter mir gestanden, was mir sehr viel bedeutet.