

Aus dem Nationalen Referenzzentrum für Borrelien am
Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
Präsident: Dr. med. Andreas Zapf

**Untersuchungen zur Prävalenz und Dynamik von *Ixodes ricinus* und
deren Infektionsrate mit *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Bayern
sowie zur Diagnostik von *Borrelia burgdorferi sensu lato* mittels
real-time PCR**

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

vorgelegt von
Lars-Malte Teußler

aus
München

Jahr
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. phil. Andreas Sing

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Franz Worek
Prof. Dr. Hubert Hilbi

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

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 08.10.2015

*Gebraucht der Zeit, sie geht so schnell von hinnen,
Doch Ordnung lehrt Euch Zeit gewinnen.
Goethe, Faust*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i>	1
1.2 Übertragung der Borrelien	2
1.3 Verteilung und Morphologie von <i>B. burgdorferi</i> s.l.	3
1.4 Klinik der Lyme-Borreliose	4
1.5 Diagnostik der Lyme-Borreliose	5
1.6 Therapie der Lyme-Borreliose	5
1.7 Die PCR	6
1.7.1 Prinzip	7
1.7.2 Die real-time PCR	8
1.7.3 Multiplex-PCR	10
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	10
2. Material und Methoden.....	12
2.1 Abflagen der Zecken	12
2.2 DNA-Isolation	13
2.3 Screening der Zeckenisolate	15
2.3.1 <i>p41</i> real-time PCR	15
2.3.1.1 Durchführung	15
2.3.1.2 Auswertung	17
2.4 Differenzierung der <i>B. burgdorferi</i> s.l. Spezies in PCR-positiven Zecken	17
2.4.1 <i>hbb</i> real-time PCR	17
2.4.1.1 Durchführung	17
2.4.1.2 Auswertung	20
2.4.2 <i>ospA</i> semi-nested PCR	20
2.4.2.1 Durchführung	21
2.4.2.2 Speziesidentifikation	23
2.4.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus	23
2.4.3.1 Durchführung	24
2.4.3.2 Auftrennung der Restriktionsfragmente	25
2.4.4 Sequenzierung	26
2.4.4.1 Bioanalyzer	26
2.4.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts für die Sequenzierung	27
2.4.4.3 Sequenzier-PCR	27

2.4.4.4 Zweite Aufreinigung	28
2.4.4.5 Sequenzieranalyse	29
2.4.4.6 Auswertung	29
2.5 Optimierung der Borreliendiagnostik	29
2.5.1 Attomol „ <i>B. burgdorferi</i> real-time“	29
2.5.1.1 Herstellung der Verdünnungsreihen	30
2.5.1.1.1 PicoGreen-Messung	30
2.5.1.1.2 Herstellung von Verdünnungsreihen aus den vermessenen Proben	31
2.5.1.2 Durchführung Attomol-Kit	31
2.5.1.3 Bestimmung der Nachweisgrenze	33
2.5.1.4 Bestimmung der Spezifität	33
2.5.2 Validierung eines neuen Duplex real-time PCR-Ansatzes	34
2.5.2.1 Optimierung	35
2.5.2.2 Durchführung	35
2.5.3 Triplex-Ansatz	36
2.5.4 Auswertung	37
2.5.5 LOD-Bestimmung	37
2.5.6 Effizienzberechnung	38
2.6 Statistische Analyse	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Abflaggen der Zecken	39
3.2 Zeckenaktivität	39
3.3 Zeckenaktivität und Klima	40
3.3.1 Zeckenaktivität und Temperatur	40
3.3.2 Zeckenaktivität und Luftfeuchtigkeit	41
3.3.3 Zeckenaktivität und Beschattung	42
3.4 Zeckenaktivität und Höhe	42
3.5 Zeckenaktivität und Vegetation	43
3.6 Zeckenaktivität und Vogelbestand	43
3.7 DNA-Extraktion	43
3.8 <i>p41</i> real-time PCR	43
3.9 <i>hbb</i> real-time PCR	44
3.10 <i>ospA</i> semi-nested PCR	46
3.10.1 Bioanalyzer	47

3.10.2 RFLP und Sequenzierung	48
3.11 Prävalenzstudie im Rahmen der VICCI-Studie	49
3.11.1 Infektionsraten von <i>Ixodes ricinus</i> mit Borrelien	50
3.11.2 Verteilungsmuster von <i>Borrelia</i> spp. in Bayern	51
3.11.3 Mehrfachinfektionen	54
3.12 Optimierung der Borrelien-Diagnostik	55
3.12.1 Ergebnisse der Pico-Green Messungen	55
3.12.2 Validierung des Attomol-Kits	55
3.12.3 Spezifitätstestung für das Attomol-Kit	58
3.13 Validierung der neudesignten real-time PCR-Ansätze	59
3.13.1 Duplex real-time PCR-Ansatz	59
3.13.2 Triplex real-time PCR-Ansatz	63
3.13.3 Auswertung und LOD-Bestimmung	64
3.13.4 Effizienzberechnung	67
4. Diskussion.....	69
4.1 Zeckenaktivität	69
4.2 Zeckenaktivität und Klima	70
4.2.1 Zeckenaktivität und Temperatur	70
4.2.2 Zeckenaktivität und Luftfeuchtigkeit	71
4.2.3 Zeckenaktivität und Beschattung	71
4.3 Zeckenaktivität und menschlicher Einfluss	71
4.4 Zeckenaktivität und Höhe	72
4.5 Zeckenaktivität und Vegetation	73
4.6 Zeckenaktivität und Vögel	73
4.7. Prävalenzstudie	74
4.7.1 Infektionsraten	74
4.7.2 Verteilung der einzelnen Borrelienspezies	75
4.7.3 Mehrfachinfektionen	77
4.8 Verbesserung der Diagnostik	77
4.8.2 Duplex-und Triplexansatz	79
5. Zusammenfassung.....	83
Abbildungsverzeichnis.....	85
Literaturverzeichnis	87
Anhang.....	102
Danksagung.....	109

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Präsentationen.....	110
Eidesstattliche Versicherung.....	111

Abkürzungsverzeichnis

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
BBQ	BlackBerry Quencher
Bp	Basenpaare
BW	Bayerischer Wald
°C	Grad Celsius
Cp	Crossing point
Ct	Crossing threshold
Cy5	Cyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleid acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Extraktionskontrolle
EG	Englischer Garten
FAM	6-Carboxyfluoreszein
<i>fla</i>	Flagellin
HEX	Hexachlorfluoreszein
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
<i>L.</i>	<i>Leptospira</i>
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LOD	Limit of detection
m ²	Quadratmeter
ml	Milliliter
m ü. NN	Meter über Normalnull
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
ng	nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPBW	Nationalpark Bayerischer Wald
NRZ	Nationales Referenzzentrum
NTC	Non-template control
OSH	Oberschleißheim

<i>ospA</i>	Outer surface protein A
PBS	phosphate-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PK	Positivkontrolle
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
rpm	rounds per minute
Sek	Sekunden
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
T _m	Schmelzpunkt (melting temperature)
V	Volt
VICCI	Vector-borne infectious diseases in climate change investigation

1. Einleitung

Die Lyme-Borreliose ist die häufigste zeckenübertragene Erkrankung der nördlichen Hemisphäre und daher von großer Bedeutung für das Gesundheitswesen. Da erst seit einigen Jahren in einzelnen Bundesländern eine Meldepflicht besteht, liegen für Deutschland keine umfassenden Daten vor. Das Robert-Koch-Institut beziffert die Inzidenz in den östlichen Bundesländern basierend auf der dort eingeführten länderspezifischen Meldepflicht auf 18-38 Fälle/100000 Einwohner/Jahr (Robert Koch-Institut, Epidemiologisches Bulletin 12/2010). Auch für Europa gibt es äußerst variable Daten. So werden Inzidenzen von 0,8-300/100000 Einwohner/Jahr berichtet (World Health Organization Regional Office for Europe 2006).

Als Erreger dieser wichtigen, aber oft unterschätzten Krankheit konnte erst 1982 nach langer Suche *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato (s.l.) identifiziert werden (Burgdorfer et al. 1982).

1.1 Der Vektor *Ixodes ricinus*

Die Krankheitsüberträger der Lyme-Borreliose, Schildzecken, gehören in Europa v.a. der Art *Ixodes (I.) ricinus* und in Asien *I. persulcatus* an, in den USA dagegen *I. scapularis* und *I. pacificus* (Burgdorfer 1984). Sie durchlaufen in ihrer Entwicklung drei Stadien: als erstes das der noch 6-beinigen Larven, dann das der 8-beinigen Nymphen, ehe sie nach zwei bis mehr als drei Jahren zu adulten Zecken herangereift sind; zwischen den Stadien liegt jeweils eine Blutmahlzeit. Als Wirte kommt ein breites Spektrum von mehr als 200 Wirbeltierarten, wie Wild, Nager Vögel und Eidechsen in Frage und eben auch der Mensch. Die Zecken erwerben *B. burgdorferi* s.l. durch Blutmahlzeiten, eine transovariable Übertragung ist nur selten beschrieben worden (de Sonenshine 1993, Wilske et al. 1987). *I. ricinus* verbringen über 90% ihrer Lebenszeit ohne Wirtkontakt (Needham and Teal 1991). Auf ihrer Wirtssuche halten sie sich in bodennaher Vegetation (meist 0-30 cm) auf. Mit hochsensiblen Sinnesorganen, den sog. Hallerschen Organen (s. Abb. 1), die an den Vorderbeinen sitzen, reagieren sie besonders empfindlich auf Temperatur und Vibration und erkennen so einen sich nähernden Wirt. Mit einem ebenfalls an den Vorderbeinen befestigten speziellen Halteapparat hält die Zecke sich nun am Wirt fest und lässt sich von ihm mitnehmen. Darauf beginnt sie mit der Suche nach einer geeigneten Saugstelle, was mehrere Stunden dauern kann.

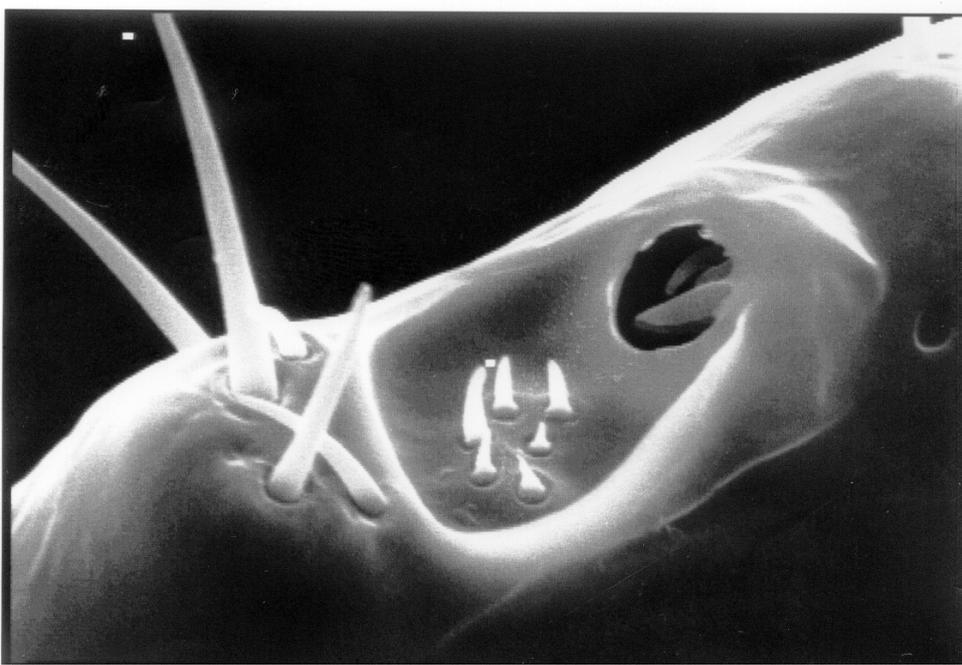
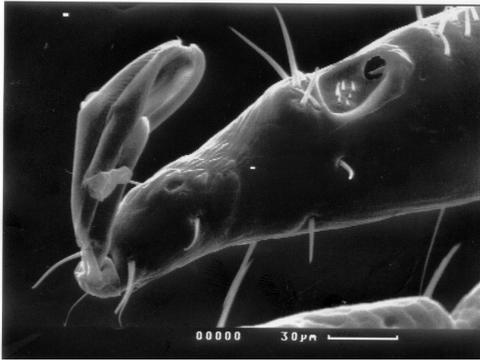


Abbildung 1: Hallersche Organe (Quelle: NRZ für Borrelien)

Durch ihre enorme Wirtsvielfalt übertragen Zecken allerdings auch andere Krankheitserreger, wie *Borrelia myiamotoi* (eine Rückfallfieber-Borreliose), *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* und das FSME-Virus. Damit ist die Zecke einer der wichtigsten Überträger von Infektionskrankheiten weltweit (vgl. für den ganzen Abschnitt Fingerle et al. 2011).

1.2 Übertragung der Borrelien

Schildzecken der Gattung *I.* erwerben Borrelien bei infizierten Tieren. V.a. Vögel und Mäuse sind bekannte Reservoirwirte (Gern et al. 1998). Nach Aufnahme ziehen sich die Bakterien in den Darm der Zecke zurück. Nachdem die Zecke einen neuen Wirt und auf diesem eine entsprechende Stelle für die Blutmahlzeit gefunden hat, gelangen die Borrelien in einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Proteine mit zunehmender Länge des Saugaktes in die

Speicheldrüsen und schließlich in das Blut des Opfers. Daher kann frühestens nach mehreren Stunden eine Übertragung der Borrelien stattfinden (Kahl et al. 1998, Fingerle et al. 2011).

1.3 Verteilung und Morphologie von *B. burgdorferi* s.l.

Die Borreliose wird von Vertretern des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplex verursacht. Nach der Entdeckung des Erregers wurde zunächst von einer homogenen Spezies *Borrelia burgdorferi* ausgegangen (Johnson et al. 1984a, Johnson et al. 1984b). Im Lauf der Jahre zeigte sich aber, dass es eine heterogene Verteilung gibt. So ist in Amerika fast ausschließlich *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.) zu finden, in Europa dagegen gibt es deutlich mehr Spezies (Stanek and Reiter 2011). Insgesamt werden derzeit 20 Genospezies dieses Komplexes weltweit gezählt. Gesichert humanpathogen sind *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*. Für *B. valaisiana*, *B. bissettii* und *B. lusitaniae* gibt es zudem einzelne Fallberichte von Isolationen bzw. Nachweis mittels PCR aus humanem Probenmaterial. Ob und inwieweit die letztgenannten Spezies humanpathogen sind, ist noch unklar.

B. burgdorferi s.l. gehört zur Gattung der gramnegativen Spirochäten und ist korkenzieherähnlich gebaut. Sieben bis elf Endoflagellen unter der äußeren Zellmembran erlauben es eine schraubenförmige Fortbewegung (Barbour and Hayes 1986). Die Generationszeit liegt in vitro unter optimalen Bedingungen zwischen 8 und 30 Stunden (Preac-Mursic and Wilske 1993).

B. burgdorferi s.l. besitzt ein lineares Chromosom mit einer Länge von ungefähr 950000 Basenpaare (Bp) und mehrere – ca. 20 – zirkuläre und lineare Plasmide (Barbour 1988, Barbour and Garon 1987, Ferdows and Barbour 1989, Casjens et al. 1995, Fraser et al. 1997). Auf diesen werden auch die wichtigen Oberflächenproteine „Outer surface protein A“ (OspA) und „Outer surface protein C“ (OspC) kodiert. Diese beiden Proteine spielen eine herausragende Rolle bei der Anpassung der Borrelie an die Zecke bzw. an den Wirt. So wird die Expression von OspA hauptsächlich in der Zecke aktiviert (Fingerle et al. 1995, Schwan et al. 1995), während OspC erst beim Saugakt exprimiert wird (Fingerle et al. 2000, Fingerle et al. 2002, Schwan and Piesman 2000).

1.4 Klinik der Lyme-Borreliose

Die Borreliose selbst kann sich als Multi-System-Erkrankung mit einer Vielzahl von Symptomen äußern. Die Klinik kann sehr variabel sein, was die Diagnosestellung erschwert. Der Verlauf und die Symptome der Borreliose werden in Früh- und Spätphase unterteilt, wobei erstere wiederum in ein lokales und ein disseminierte Stadium unterteilt und letztere als persistierende Infektion bezeichnet wird. In jedem Stadium kann die Lyme-Borreliose spontan ausheilen (Krause and Fingerle 2009).

In der Frühphase fällt lokal wenige Tage bis vier Wochen nach dem Zeckenstich bei etwa 70-90% der Patienten an der Eintrittsstelle ein sog. Erythema migrans (Wanderröte) auf. Dieses wird als makulo- bis papulöse Effloreszenz beschrieben, die sich bei typischem Verlauf zu einem zentral ablassenden, ringförmigen Erythem entwickelt. Klinik, Farbe und Dauer sind variabel. Allgemeinsymptome wie Fieber, Myalgien und Kopfschmerz können auftreten.

Haben sich die Borrelien im Körper ausgebreitet, ist die Infektion disseminiert. Die meisten Patienten entwickeln hierauf neurologische Symptome. So tritt häufig eine Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom) mit Hirnnervenparesen oder starken radikulären Schmerzen auf. Bei Kindern dagegen findet man häufiger isolierte Fazialisparese oder Meningitiden. Auch ein Borrelien-Lymphozytom kann in diesem Stadium auftreten. Es handelt sich hierbei um einen rötlichen-lividen Hauttumor; seine Prädispositionsstelle sind Ohr läppchen, Skrotum oder Mamille. Sehr selten kann sich die Lyme-Borreliose auch im Rahmen einer Karditis mit AV-Blockierungen wechselnden Grades manifestieren, die lebensbedrohlich werden kann.

Die Spätphase tritt oft erst Monate oder Jahre später ein. Hauptsymptom kann eine chronische Monoarthritis, v.a. im Knie, sein. Eine Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) wird nur in Europa beobachtet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen Hauttumor, der sich in einer Atrophie der Haut mit livider Verfärbung äußert. Sehr selten können auch Enzephalomyelitiden mit begleitenden Para- oder Tetraparesen auftreten. Chronische Verläufe sind für dieses Stadium beschrieben worden, sind aber sehr selten. Viel öfter tritt eine Spontanremission der Symptome ein (vgl. für das ganze Kapitel Krause and Fingerle 2009, Mygland et al. 2010, Stanek et al. 2012).

1.5 Diagnostik der Lyme-Borreliose

Die Diagnose der LB basiert zunächst auf entsprechenden klinischen Symptomen und anamnestischen Daten und soll – abgesehen vom typischen Erythema migrans – mit entsprechenden labordiagnostischen Methoden substantiiert werden.

Die Antikörperbestimmung liefert etwa 10-14 Tage nach Infektion mit dem Nachweis von IgM-Antikörpern erste Ergebnisse. IgG-Antikörper sind nach etwa drei bis sechs Wochen nachweisbar. Im Frühstadium der Krankheit kann es also negative Ergebnisse i.S. einer diagnostischen Lücke geben; fehlt dann noch das Erythema migrans, ist eine Diagnose aufgrund von unspezifischen Symptomen sehr schwer zu stellen. Im früh disseminierten Stadium sind IgM-Antikörper in 70-90% der Fälle zu finden. Zusätzlich wird bei Neuroborreliose i.d.R. eine intrathekale Antikörperproduktion beobachtet. Eine Liquoranalyse kann deshalb wichtige Hinweise liefern. In der Spätphase schließlich sind hohe IgG-Titer nachweisbar, IgM ist kaum mehr zu finden. Die Serologie sollte stets stufenweise erfolgen. Auf einen durch hohe Sensitivität gekennzeichneten IgM-/IgG-ELISA, sollte bei reaktiven Fällen ein spezifischer Immunoblot folgen (vgl. für diesen Abschnitt Wilske et al. 2007).

Desweiteren kann bei akuter Neuroborreliose auch das Chemokin CXCL13 aus dem Liquor als diagnostischer Parameter hinzugezogen werden (Rupprecht et al. 2005, Schmidt et al. 2011, Rupprecht et al. 2014).

In atypischen Fällen können weitere Verfahren eingesetzt werden, um die Diagnose zu stellen. Als klassisches Verfahren des direkten Erregernachweises gilt die Kultur. *B. burgdorferi* s.l. ist mit speziellen Nährmedien anzüchtbar (Barbour 1984); diese Methode ist allerdings sehr arbeits- und zeitaufwendig. Als weiteres Verfahren bietet sich deshalb die Polymerasekettenreaktion (PCR) an. Sie wird zum Nachweis von Borrelien-DNA in klinischen Proben eingesetzt, um die schwierige Diagnosestellung der Lyme-Borreliose zu verbessern. Aus klinischer Sicht sind PCR-Analysen vor allem bei solchen Patienten anzustreben, bei denen der Verdacht auf eine Lyme-Borreliose besteht, diese Diagnose sich jedoch mit herkömmlichen Methoden nicht sichern lässt. Die PCR hat ihre höchste Sensitivität in Haut-Biopsien (50-70%) sowie in Synovialis-Biopsien und Gelenk-Punktaten (50-70%), eine deutlich geringere dagegen im Liquor (10-30%) (Wilske et al. 2007).

1.6 Therapie der Lyme-Borreliose

Die Therapie der Borreliose muss antibiotisch und möglichst schon in den Frühstadien erfolgen, um Spätfolgen zu minimieren. Eine ausführliche Übersicht, aufgeteilt in die

einzelnen Manifestationen ist in Tab. 1 dargestellt. Die frühe Lyme-Borreliose ist hiermit i.d.R. kuriert. Auch eine Therapie der späteren Manifestationen ist gewöhnlich erfolgreich. Therapierefraktäre und chronische Verläufe sind selten. Ob eine deutlich längere Antibiotikagabe für die fragliche chronische Lyme-Borreliose erforderlich ist, ist derzeit Gegenstand kontroverser Diskussionen; der aktuelle Forschungsstand allerdings erlaubt es nicht, eine solche Diagnose zu stellen (Kaiser und Fingerle 2009, Krause und Fingerle 2009 Herzer et al. 2014).

Tabelle 1: Antibiotische Therapie der verschiedenen Manifestationen der Lyme-Borreliose (Krause und Fingerle 2009)

Klinisches Bild	Antibiotikum und Dosis	Applikation	Behandlungsdauer
Erythema migrans	Doxycyclin 2 x 100 mg	p.o.	10-21 Tage
	Amoxicillin 3-4 x 500-1000 mg		14-21 Tage
	Cefuroxim 2 x 500 mg		14-21 Tage
	Azithromycin 500 mg		2-5 Tage
Neuroborreliose ¹	Doxycyclin 2-3 x 100 mg	p.o.	14-21 Tage
	Ceftriaxon 1 x 2 g		
	Cefotaxim 3 x 2 g	i.v.	
	Penicillin G 4-5 Mio E		
Lyme-Arthritis, ACA	Doxycyclin 2 x 100 mg	p.o.	30 Tage
	Amoxicillin 3 x 500-1000 mg		
	Ceftriaxon 1 x 2 g	i.v.	14-21 Tage
	Cefotaxim 3 x 2 g		
Lyme-Karditis	Ceftriaxon 1 x 2g	i.v.	14 Tage
	Cefotaxim 3 x 2 g		
	Penicillin G 4-5 Mio E		

p.o. = per os, i.v. = intravenös; ¹ bei chronischer Neuroborreliose i.v. Therapie für 14-28 Tage

1.7 Die PCR

Diese Methode ist die Grundlage dieser Arbeit und wird daher in den nächsten Kapiteln ausführlich dargestellt. Einerseits ist sie mittlerweile Standardmethode für Prävalenzstudien, z.B. für entsprechende Pathogene in ihren Vektoren, da ihre Leistungsdaten (Sensitivität und Spezifität) und ihre Schnelligkeit immer weiter verbessert wurden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass seit Ende der 1980er-Jahre weit über 100 Protokolle publiziert wurden (Schmidt 1997, Rosa and Schwan 1989). Andererseits ist sie auch aus der Diagnostik der Lyme-Borreliose nicht mehr wegzudenken.

1.7.1 Prinzip

Die PCR ist eine moderne Methode zum Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnitts (Saiki et al. 1985). Voraussetzung ist, dass die Sequenz des Abschnitts bekannt ist, damit rechts und links davon komplementäre Oligonukleotide, sog. Primer, über Wasserstoffbrückenbindungen binden können. Von deren 3'-Ende kann eine hitzestabile Polymerase einen neuen DNA-Strang synthetisieren.

Die PCR beginnt mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C, wodurch die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge gespalten werden. Hierauf können jetzt die spezifischen Primer an ihre komplementären Sequenzen binden: dies wird Annealing genannt. Die Annealing-Temperatur hängt vom GC- und AT-Gehalt der Primer ab und kann nach folgender Formel (Rychlik et al. 1990) berechnet werden:

$$T_a^{opt} = 0,3 \times T_m^{Primer} + 0,7 \times T_m^{Produkt} - 14,9$$

Im letzten Teil, der Elongation, synthetisiert eine hitzestabile Polymerase bei 72 °C einen neuen Strang. Somit wird die Ziel-DNA in jedem Zyklus verdoppelt. Dieser wird ca. 20-40-mal wiederholt, um eine ausreichende Menge zu erhalten; im besten Fall vermehrt sich die Zielsequenz dabei exponentiell (s. Abb. 2).

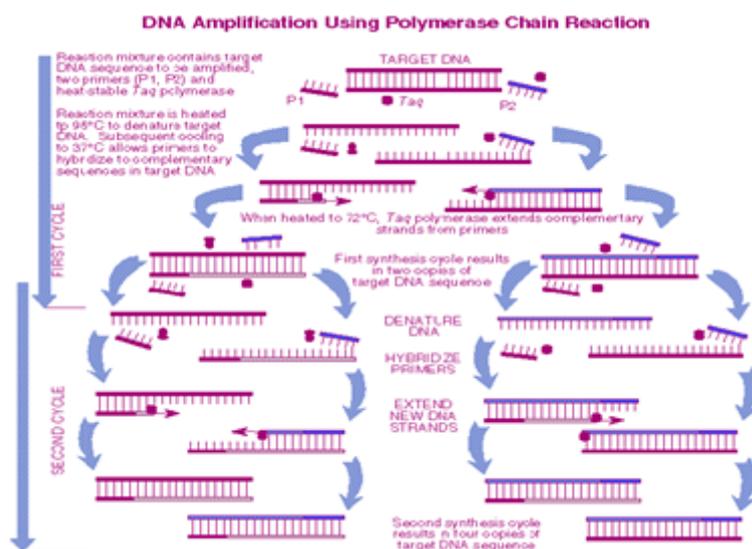


Abbildung 2: Prinzip der PCR (nach http://openwetware.org/wiki/BME103:T130_Group_3)

Ein Beispiel für eine konventionelle PCR ist die semi-nested PCR. Bei dieser Methode werden zwei Polymerase-Kettenreaktionen miteinander verknüpft. Nach Ablauf einer Reaktion mit 45 Zyklen wird das Produkt hierauf wiederum in einer PCR verwendet. Dabei wird in der zweiten Reaktion ein neues Primerpaar eingesetzt, das innerhalb des ersten

Amplifikates bindet. Das gilt auch als Nachweis der Spezifität des ersten Reaktionsproduktes. Erst das Produkt der zweiten PCR wird detektiert.

1.7.2 Die real-time PCR

Die real-time PCR ist eine Methode zur Detektion eines DNA-Abschnitts in Echtzeit und somit eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR. Dadurch ist es möglich, das PCR-Produkt simultan zur Amplifikation zu visualisieren. Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers ist dafür verantwortlich (Cardullo et al. 1988). Hierbei überträgt ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) Energie, die es durch externe Anregung erhalten hat, auf ein anderes, räumlich entferntes Fluorochrom. Dieses emittiert wiederum die Energie und das dabei entstehende Lichtsignal kann photometrisch gemessen werden. Dies ermöglicht auch eine Aussage über die Quantität, da das detektierte Signal proportional zur übertragenen Energie ist. Je nachdem wie weit die beiden Fluorochrome voneinander entfernt sind, bezeichnet man sie entweder als Reporter und Quencher (weit entfernt) oder als Donor und Akzeptor (nah beieinander).

Aufgrund dieser Phänomene wurden mehrere Prinzipien, zwei Fluorochrome miteinander zu kombinieren, entworfen. Allen gemein ist, dass zum PCR-Ansatz spezielle Oligonukleotide, sog. Sonden, gegeben werden, die an beiden Enden mit einem Farbstoff markiert sind: am 5'-Ende ein Reporter (Fluoreszenz-Abgeber) und am 3'-Ende ein Quencher (Unterdrücker der Fluoreszenz).

Ein gängiges Modell ist das TaqMan-Modell (Livak et al. 1995). Bei der Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts wird die TaqMan-Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase gespalten und der Reporter vom Quencher freigesetzt (s. Abb. 3). Da das Signal nun nicht mehr unterdrückt wird, kann die dabei ansteigende Fluoreszenz gemessen werden. Je mehr Ziel-DNA in der Probe ist, desto stärker ist das Fluoreszenz-Signal: dadurch kann sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Bewertung der DNA vorgenommen werden.

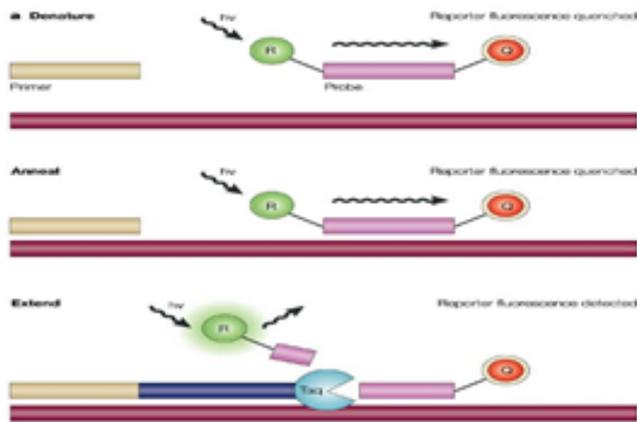


Abbildung 3: Prinzip des TaqMan-Modells (www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig_tab/nrd1496_F1)

Ein anderes Modell ist das der Molecular Beacons (Tyagi und Kramer 1996): Reporter und Quencher sind hier durch eine Haarnadelstruktur, die 5'- und 3'-Ende der Sonde verbindet, in räumlicher Nähe (s. Abb. 4). Das Fluoreszenz-Signal wird effektiv unterdrückt. Durch den Hybridisierungsvorgang an der Zielsequenz wird die Haarnadelstruktur aufgelöst, der nunmehr befreite Reporter kann seine Energie abgeben.

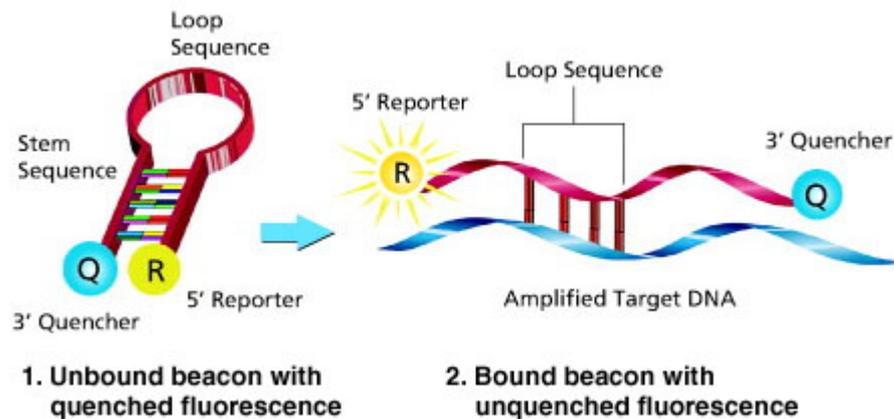


Abbildung 4: Prinzip der Molecular beacons (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/molecular-beacons.html>)

Wenn bei der Auswertung einer real-time PCR Fluoreszenz gegen Zeit bzw. Zyklenzahl aufgetragen wird, wird eine Kurve generiert, die am Anfang exponentiell, dann linear und zum Ende hin plateauartig verläuft. Man definiert dann anhand der y-Achse einen Schwellenwert (sog. Threshold), bei dessen Überschreiten die exponentielle Phase der PCR beginnt und die Fluoreszenz erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Dieser Punkt wird Crossing threshold (Ct) oder Crossing point (Cp) genannt.

1.7.3 Multiplex-PCR

Eine Multiplex-PCR ist eine Möglichkeit mehrere Gene gleichzeitig zu detektieren und damit zeit- und materialsparend arbeiten zu können. Die Auswertung ist möglich durch den Gebrauch der jeweiligen Primer für das Gen sowie verschiedener Sonden mit unterschiedlichen Farbstoffen, die in unterschiedlichen Kanälen am PCR-Gerät isoliert voneinander betrachtet werden können. Die Evaluierung eines solchen Systems ist zeitaufwendig, da bei zu hohen Konzentrationen der einzelnen Komponenten die Fluoreszenzen sich gegenseitig überstrahlen und damit das Signal auslöschen können. Zudem sind die Nukleotide im Ansatz schneller verbraucht, wenn mehrere Polymerasen gleichzeitig arbeiten. Sind aber die richtigen Konzentrationen eingestellt und genügend DNA-Bausteine durch Verwendung geeigneter Mastermixe vorhanden, besitzt man ein weitestgehend sicheres und effizientes System (Sint et al. 2012).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

In den vorausgegangenen Kapiteln wurden die Charakteristika und die Bedeutung von Zecken, vektorübertragenen Erkrankungen und des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes dargestellt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich aufgrund erhöhter Durchschnittstemperaturen infolge des Klimawandels v.a. die Zeckenaktivität immer weiter nach Norden ausbreiten wird (Jaenson et al. 2012) und auch andere Pathogene davon erfasst werden (Schröder und Schmidt 2008). Denn grundsätzlich sind Zecken stark von klimatischen Variablen beeinflusst (Medlock et al. 2013).

Für Bayern lagen für diese Fragestellung noch keine Daten vor. Um die Auswirkungen des Klimawandels auf vektorübertragene Erkrankungen zu dokumentieren, wurde 2009 daher der interdisziplinäre Forschungsverbund „Vector-borne Infectious Diseases in Climate Change Investigations“ (VICCI) von mehreren Organisationen und Universitäten in Bayern, darunter auch das Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Borrelien, gegründet. Als Grundlage für die Etablierung von Surveillancesystemen sollten mit dem VICCI-Projekt Basisdaten zu verschiedenen Vektoren und Wirten erhoben werden, um zukünftige Entwicklungen und Gefährdungen von vektorübertragenen Krankheiten besser einschätzen zu können.

Im Rahmen des Teilprojektes „Prospektive Studie zur Entwicklung von *Borrelia burgdorferi* s.l. Spezies in *Ixodes ricinus* in Bayern“ sollten daher in den Jahren 2010 und 2011 nüchterne Zecken an Gebieten in Bayern, die unterschiedliche Habitate darstellten, gesammelt und die Zeckenaktivität im Kontext mit klimatischen Bedingungen – wie Temperatur,

Luftfeuchtigkeit und Beschattung – bestimmt werden. Zugleich sollten alle gefangenen Zecken molekularbiologisch auf Borrelien untersucht werden. Im Falle einer Infektion sollte des Weiteren die genaue Genospezies identifiziert werden, um auch deren unterschiedliche Verteilungsmuster in Bayern darstellen zu können. Diese Arbeit befasst sich mit den Daten aus dem Jahr 2011.

Eine weitere Aufgabe des NRZ für Borrelien besteht in der Diagnostik der Lyme-Borreliose und deren stetigen Weiterentwicklung. Neben den üblichen Methoden wie Antikörpernachweise und Kultivierung von Borrelien, sind auch die PCR bzw. real-time PCR von entscheidender Bedeutung. Hierfür wurden bereits einige kommerzielle Kits bzgl. ihrer Sensitivität und Spezifität in früheren Arbeiten (Brenauer 2015) evaluiert.

Als zweites Ziel dieser Arbeit sollte deshalb zum einen ein weiteres kommerzielles Kit in dieser Arbeit auf seine Leistungsdaten hin überprüft werden. Hierfür wurden eine Vielzahl humanpathogener und nicht-humanpathogener Genospezies des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes aus der Stammsammlung des NRZ für Borrelien genutzt. Es sollte besonders darauf geachtet werden, inwieweit die bislang gesichert humanpathogenen Borrelien von dem Kit zuverlässig erkannt werden.

Zum anderen war es die Aufgabe, die zwei am häufigsten benutzten Gene in einem Multiplex-Ansatz zu kombinieren, da bisher solche Ansätze für die Diagnostik der Lyme-Borreliose selten sind und diese Methode eine immer größere Rolle spielen wird. Zur besseren Vergleichbarkeit sollten Sensitivität und Effizienz bestimmt werden. Dieser neue Ansatz soll die Evaluierung der kommerziellen Kits sinnvoll ergänzen und neue Spielräume aufzeigen, um die Diagnose Lyme-Borreliose sicherer stellen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Abflagen der Zecken

Zum Sammeln der Zecken wurden unterschiedliche Orte in Bayern ausgewählt, die sich bzgl. Höhe, Landnutzung und Bewuchs unterschieden. Dokumentierte Variablen waren geographische (Höhe, Vegetation) und klimatische (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) Verhältnisse, Beschattung und anthropogene Einflüsse (landwirtschaftliche Nutzung, Nationalpark, Naherholung).

Die einzelnen Orte waren der Englische Garten in München (Naherholungsgebiet mit lockeren Laub-Mischwaldbeständen, umgeben von Wiesen), Oberschleißheim im Norden von München (begraster Waldweg in einem Mischwald, entlang des Wegrands Sträucher), Lindau (Laub-Mischwald, an Obstanbau grenzend) sowie siebzehn Standorte im Bayerischen Wald (BW), die sowohl im Nationalpark Bayerischer Wald (NPBW) als auch außerhalb davon lagen (s. Anhang 1). Die Sammelstellen in dieser Region waren entlang eines Höhengradienten (300-1360 m) verteilt. Alle Beprobungspunkte sind zur besseren Orientierung in Abb. 5 dargestellt.

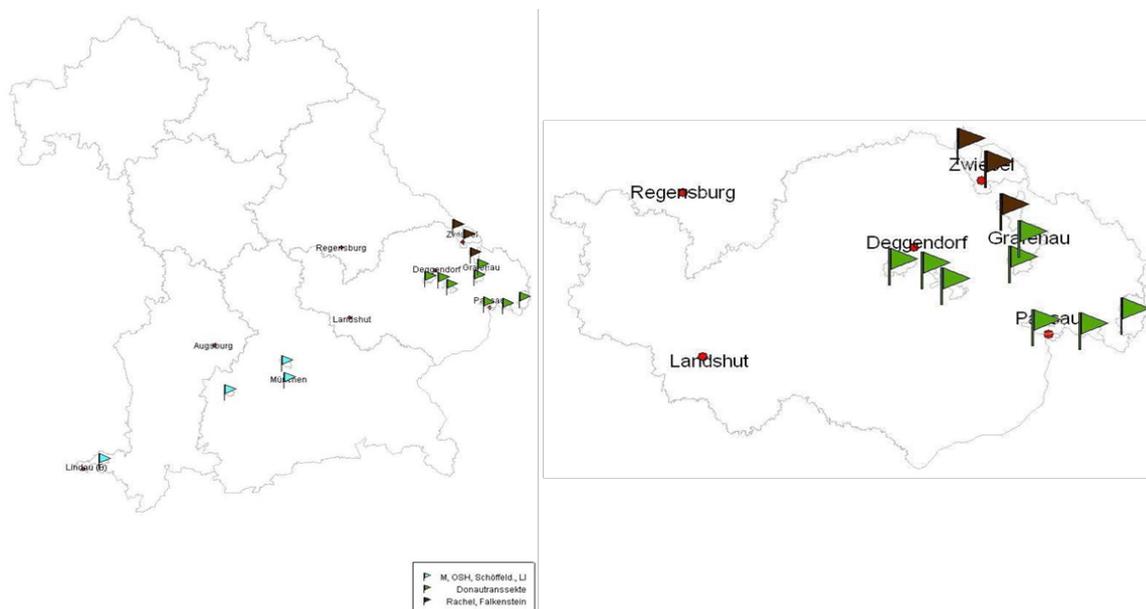


Abbildung 5: Auf der Karte sind alle Beprobungsorte in Bayern eingezeichnet. Die Beprobungsorte liegen entlang eines Höhengradienten von 318 – 1360m in der Region Bayerischer Wald (grün; 8 Beprobungspunkte) und Nationalpark Bayerischer Wald (NPBW, braun; 10 Beprobungspunkte, verteilt innerhalb der drei dargestellten Punkte).

Jeder Standort wurde in vier je 100 m² große Beprobungsstellen aufgeteilt, die nacheinander nachmittags und in den frühen Abendstunden abgeflagt wurden. Zur Dokumentation der langfristigen, klimatischen Verhältnisse wurden Daten-Logger (EL-USB-2, Lascar

Electronics, Erie, USA) angebracht, die Temperatur und Luftfeuchtigkeit stündlich aufzeichneten. Beim Sammeln wurden zusätzliche Daten-Logger ausgelegt, um aktuelle Klimadaten der Beprobung zu akquirieren. Für den Bayerischen Wald wurden zudem von der Nationalparkverwaltung Klimadaten zur Verfügung gestellt.

Die Zecken wurden mit 1 m² großen, aufgerauten weißen Baumwolltüchern abgeflaggt, wobei die Tücher über die niedrige Vegetation gezogen wurden. Alle fünf Meter wurden die Tücher nach Zecken abgesucht (Estrada-Peña et al. 2013). Gefangene Tiere wurden in mit Ethanol (70%) gefüllten 50 ml Falcon-Tubes (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) gesammelt. Im Labor wurden die Zecken nach Entwicklungsstatus und Geschlecht sortiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in identischen Tubes gelagert.

Alle erfassten Daten wie Tag, Uhrzeit, Koordinaten (Längen/Breitengrad), Höhenlage (Meter üNN), Landnutzung, Art der Vegetation, Beschattung (in %) und Sonneneinstrahlungswinkel wurden für jede Zecke in einer relationalen Datenbank (MS Access 2003) erfasst und im Laufe der Zeit um Labordaten ergänzt.

2.2 DNA-Isolation

Um die DNA-Isolation aus der großen Probenzahl zu bewerkstelligen, wurde eine automatische DNA-Extraktion (BioSprint96 One-For-All Vet, Qiagen, Hilden, Deutschland) ausgewählt. Ihr liegt eine magnetische Trennung zu Grunde, wobei die DNA-Moleküle innerhalb der Waschschriffe an magnetische Partikel im Reaktionsansatz binden und dann aus der Matrix durch einen Magneten separiert werden können. Parallel zu den zu untersuchenden Proben wurden alle Positiv- und Negativkontrollen ebenfalls mit dieser Methode isoliert.

Zuerst wurden die Zecken mit Hilfe eines Einmalspatels unter sterilen Bedingungen in einem Tropfen phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Qiagen, Hilden, Deutschland) zerdrückt. Vor allem der Zeckendarm, in dem sich die Borrelien bevorzugt befinden, wurde besonders kräftig zerrieben.

Jede einzelne Probe wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 200 µl gebracht und im nächsten Schritt mit 200 µl Lysepuffer (Lysis-Buffer Roche, Mannheim, Deutschland) und 40 µl Serin-Proteinase K (20 mg/ml, Qiagen, Hilden, Deutschland) vermengt. Anschließend wurden die Proben bei 56 °C in einem Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 350 Umdrehungen pro Minute für vier Stunden inkubiert.

Danach wurde ein Mastermix in einem separaten Mastermixraum nach Tab. 2 in steril verpackten Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Tabelle 2: Mastermixzusammensetzung der BioSprint DNA-Extraktion

Komponenten	Volumen [μ l]
Buffer AL (Qiagen, Hilden, Deutschland)	200
Isopropanol (Qiagen, Hilden, Deutschland)	200
MagAttract Suspension G (Qiagen, Hilden, Deutschland)	30
Gesamtvolumen	430

Im nächsten Schritt wurden jeweils 430 μ l des Mastermixes auf einem S-Block vorgelegt und 220 μ l der lysierten Proben hinzugefügt. Vier weitere S-Blöcke und zwei 96-Well-Platten (Qiagen, Hilden, Deutschland) wurden gemäß Tab. 3 vorbereitet. Der Block mit den Proben wurde in Slot 1 des Extraktionsgeräts gelegt, die anderen Elemente in Slot 2 bis 7. In Slot 8 schließlich kam das Rod cover, in das die magnetischen Stäbe des Geräts eingelassen wurden, um die DNA aus dem Lysat magnetisch zu isolieren und sie mit den Salzen in die Waschblöcke zu transferieren. Alle Reagenzien und Materialien stammten von Qiagen (Hilden, Deutschland).

Tabelle 3: Beschickung der einzelnen Platten für die BioSprint DNA-Extraktion

Slot	Vorgang	Format	Komponenten	Volumen pro Well [μ l]
1	Lysat	S-Block	Lysat	650
2	Waschschritt 1	S-Block	Puffer AW 1	650
3	Waschschritt 2	S-Block	Puffer AW 1	500
4	Waschschritt 3	S-Block	Puffer AW 2	500
5	Waschschritt 4	S-Block	Puffer AW2	500
6	Waschschritt 5	S-Block	RNAse free water	500
7	Elution	96-Well Platte	Puffer AE	200
8	Rod cover	96-Well Platte	-	-

Am BioSprint 96 wurde anschließend das Programm „DNA-Blood 2000“ ausgewählt. Am Ende der einzelnen Schritte lag isolierte DNA – in 150 μ l AE-Puffer eluiert – vor.

2.3 Screening der Zeckenisolate

2.3.1 *p41* real-time PCR

2.3.1.1 Durchführung

Für den folgenden Abschnitt und alle weiteren Methoden wurden die in den Mikrobiologisch-Infektiologischen Qualitätsstandards für Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (Reischl 2011) gemachten Vorgaben eingehalten.

Für das Screening der Zeckenisolate wurde ein modifiziertes *p41* real-time PCR-Protokoll nach (Schwaiger et al. 2001) verwendet. Zielsequenz ist ein 96 Basenpaar (Bp) langes Fragment des Flagellin (*fla*)-Gens. Die detaillierten Primer- und Sondensequenzen sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde für die *p41* real-time PCR

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
FlaF1, Vorwärtsprimer	5'-AGCAAATTTAGGTGCTTTCCAA-3'	Schwaiger et al. (2001)
FlaR1, Rückwärtsprimer	5'-GCAATCATTGCCATTGCAGA-3'	Schwaiger et al. (2001)
FlaProbe1, Sonde	5'-6FAM*- TGCTACAACCTCATCTGTGATTGTAGCATCTTTTATTG-- BBQ*	Schwaiger et al. (2001)

*FAM= 6-Carboxyfluoreszein; *BBQ= BlackBerry Quencher

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) bezogen. Ihre Lyophilisate wurden in nuklease-freiem Wasser (Ampuwa, Ampuwa, Grüenthal, Aachen, Deutschland) gelöst und 100 µM Stocklösungen angelegt. Die Arbeitslösungen wurden mit nuklease-freiem Wasser auf 10µM eingestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die benötigten Reagenzien für den Mastermixansatz wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermixraum nach Tab. 5 in steril verpackten Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Tabelle 5: Mastermixzusammensetzung der *p41* real-time PCR

Komponenten	Konzentration [μM]	Konzentration PCR-Ansatz [μM]	Volumen [μl]
Quantitect NoRox Multiplex Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	2x	1x	12,5
FlaF1, Vorwärtsprimer	10	0,3	0,75
FlaR1, Rückwärtsprimer	10	0,9	2,25
FlaProbe1, Sonde	10	0,2	0,50
nukleasefreies Wasser			4,0
Template, Extraktionskontrolle oder Wasser für NTC			5,0
Gesamtvolumen			25

Zusätzlich wurden in jedem PCR-Lauf eine Extraktionskontrolle (EK), eine Non-template control (NTC) und PSig2 (s. Tab. 17) als Positivkontrolle (PK) mitgeführt. Im Prä-PCR-Bereich wurden unter einer PCR Workstation (PeqLab, Erlangen, Deutschland) jeweils 20 μl des Mastermixes auf einer 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vorgelegt und 5 μl der zu untersuchenden DNA bzw. der Extraktionskontrolle oder 5 μl Wasser für die NTC hinzu pipettiert.

Die Extraktionskontrolle erlaubt den Ausschluss von Kontaminationen während des Isolationsvorgangs, die NTC zusätzlich die Reinheit der in der PCR verwendeten Komponenten zu überprüfen und somit falsch-positive Ergebnisse zu erkennen. Die 96-Well-Platte wurde abschließend sorgfältig mit einem optical film (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verschlossen und bei 1000 g für eine Minute zentrifugiert (Universal 320, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Die Untersuchungen selber wurden an einem MX 3005P Stratagene von Agilent (Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Der FAM-Kanal wurde als Detektionskanal ausgewählt und wurde achtfach verstärkt. Die Detektion erfolgte am Ende der Annealing-Phase.

Tabelle 6: Temperaturprofil der *p41* real-time PCR

Temperaturprofil	Temperatur [°C]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	900	1x
Denaturierung	95	15	45x
Annealing	60	60	

2.3.1.2 Auswertung

Nach Beendigung des Laufs fand die Auswertung mit der Software MxPro der Firma Agilent (Böblingen, Deutschland) statt. Hierbei wurde im Quantitative PCR-Modus der FAM-Kanal ausgewählt und der Threshold für jeden Lauf auf 1000 Fluoreszenz-Einheiten gesetzt.

Vor der Auswertung der eigentlichen Proben wurden die oben genannten Kontrollen auf Plausibilität geprüft. Die EK und die NTC mussten negativ sein und die PK eine erfolgreiche Amplifikation aufweisen.

Anschließend erfolgte die Auswertung der Proben, dazu wurden die Ct-Werte ermittelt und die Amplifikationskurven beurteilt. Proben mit Ct größer 40 oder einem Ct=0 wurden negativ gewertet. Die ermittelten Daten wurden in die Access-Datenbank eingepflegt.

2.4 Differenzierung der *B. burgdorferi* s.l. Spezies in PCR-positiven Zecken

2.4.1 *hbb* real-time PCR

2.4.1.1 Durchführung

Zur Speziesdifferenzierung der Borrelien wurde eine *hbb*-PCR mit Schmelzkurvenanalyse verwendet. Das Zielgen in den Untersuchungen, das 327 Bp lange *hbb*-Gen, wird in das Histon-ähnliche Protein HBb translatiert (Kobryn et al. 2000).

Die *hbb*-PCR wurde gemäß eines Protokolls nach Portnoi et al. 2006 bzw. der Modifizierung desselbigen durch Ferdin et al. 2010 durchgeführt. Eine 153 Bp lange Sequenz des *hbb*-Gens wurde amplifiziert. Primer und Sonde sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Primer und Sonde der *hbb* real-time PCR

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
Hbb 640, Vorwärtsprimer	5'- GTAAGGAAATTAGTTTATGTCTTX*TT- 3'	Ferdin et al. (2010)
Hbb Bw, Rückwärtsprimer	5'- TAAGCTCTTCAAAAAAAGCATCTA - 3'	Ferdin et al. (2010)
Hbb Fluo2, Sonde	5'-CAATGTCTGACTTAGTAACCTTTGGTCTTCTTGA--FL	Ferdin et al. (2010)

*X=LC Red640/705

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma TIB Molbio (Berlin, Deutschland) bezogen. Ihre Lyophilisate wurden in nuklease-freiem Wasser (Ampuwa, Grünenthal, Aachen, Deutschland) gelöst und 100 µM Stocklösungen angelegt. Die Arbeitslösungen wurden mit nuklease-freiem Wasser auf 10 µM eingestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die benötigten Reagenzien für den Mastermixansatz wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermixraum nach Tab. 8 in steril verpackten Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die *hbb* real-time PCR

Komponenten	Konzentration [µM]	Konzentration PCR-Ansatz [µM]	Volumen [µl]
Quantitect NoRox Multiplex Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	2x	1x	12,5
Hbb 640	10	0,5	1
Hbb Bw	10	0,2	0,4
Hbb Fluo2	10	0,2	0,4
Nukleasefreies Wasser			0,7
Template, Wasser, oder PK			5
Gesamtvolumen			20

Zusätzlich wurden in jedem PCR-Lauf eine EK, eine NTC und folgende PK: PGau, Pka2, PHei, PBr, PFin, VS116, PSig2 und PotiB2 (s. Tabelle 17) mitgeführt. Im Prä-PCR-Bereich wurden unter einer PCR Workstation (PeqLab, Erlangen, Deutschland) jeweils 15 µl des Mastermixes auf einer 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vorgelegt und 5 µl der zu untersuchenden DNA bzw. der Extraktionskontrolle oder 5 µl Wasser für die NTC hinzu pipettiert.

Die Extraktionskontrolle erlaubt den Ausschluss von Kontaminationen während des Isolationsvorgangs, wohingegen die NTC die Reinheit der in der PCR verwendeten Komponenten überprüfte. Die 96-Well-Platte wurde abschließend sorgfältig mit einer sealing foil (Roche, Mannheim, Deutschland) verschlossen und bei 1000 g für eine Minute zentrifugiert (Universal 320, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Die PCR-Untersuchungen wurden an einem LightCycler480 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Tabelle 9 zeigt das verwendete Thermoprofil der *hbb* real-time PCR.

Tabelle 9: Temperaturprofil der *hbb* real-time PCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	900	1
Denaturierung	95	10	
Annealing	50	30	55
Elongation	72	10	
	Schmelzkurve		
	95	3	
	46	30	
	75	Continuous	1
	20	10	

2.4.1.2 Auswertung

Die Auswertung und die graphische Darstellung erfolgten mit der LightCycler-480-Software (Roche, Mannheim, Deutschland). Zuerst wurde im Auswertemodus 2. Ableitung (Abs quant/2nd derivative max) überprüft, ob eine erfolgreiche Amplifikation der Positivkontrollen vorlag und ob die Mastermixkontrolle negativ war. Erst dann wurde die Amplifikation der untersuchten Proben ausgewertet. Danach wurde zur Speziesidentifikation eine Schmelzkurvenanalyse (Tm-Calling) durchgeführt. Die Schmelztemperatur wird maßgeblich von der Zusammensetzung und der Länge der Nukleotidsequenz bestimmt. Insbesondere ein vermehrter Gehalt der komplementären Basen Guanin (G) und Cytosin (C) im Amplifikat ist, verursacht durch die Ausbildung von je drei Wasserstoffbrückenbindungen untereinander, thermodynamisch stabiler als Adenin (A) und Thymin (T) mit je zwei Wasserstoffbrückenbindungen und weist somit einen erhöhten Schmelzpunkt (Tm) auf. Auch hier wurden zuerst die Positiv- als auch die Negativkontrollen auf Plausibilität geprüft. Erst dann ließen sich die unterschiedlichen Borrelien-Spezies voneinander unterscheiden, wenn man Probe für Probe gegen die mitgeführten Positivkontrollen verglich und anhand der spezifischen Schmelzkurve die Spezies identifizierte.

2.4.2 *ospA* semi-nested PCR

Zur weiteren Bestätigung und Abklärung wurde von fraglichen *hbb*-Proben das *ospA*-Gen mittels einer konventionellen semi-nested PCR nach (Michel et al. 2004) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit einer klassischen Sanger-Sequenzierung analysiert bzw. mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) die Borrelienspezies bestimmt (Michel et al. 2004). Die Zielsequenz ist das *ospA*-Gen. Dieser 800 Bp große Genomabschnitt kodiert für ein Oberflächenprotein, das allen Spezies des *B. burgdorferi* sensu lato-Komplexes gemein ist (Michel et al. 2004). Detaillierte Primersequenzen der Primär- und Sekundäramplifikation sind Tabelle 10a und b zu entnehmen.

Tabelle 10a: Verwendete Primersequenzen der *ospA*-PCR; Primäramplifikation

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
V1a, Vorwärtsprimer	5'-GGGAATAGGTCTAATATTAGC - 3'	Michel et al. (2003)
V1b, Vorwärtsprimer	5'-GGGGATAGGTCTAATATTAGC - 3'	Michel et al. (2003)
R1, Rückwärtsprimer	5'- CATAAATTCTTATTTTAAAGC - 3'	Michel et al. (2003)
R37, Rückwärtsprimer	5'- CCTTATTTTAAAGCGGC - 3'	Michel et al. (2003)

Tabelle 10b: Verwendete Primersequenzen der *ospA*-PCR; Sekundäramplifikation

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
V3a, Vorwärtsprimer	5'- GCCTTAATAGCATGTAAGC - 3'	Michel et al. (2003)
V3b, Vorwärtsprimer	5'- GCCTTAATAGCATGCAAGC - 3'	Michel et al. (2003)
R1, Rückwärtsprimer	5'- CATAAATTCTTATTTTAAAGC - 3'	Michel et al. (2003)
R37, Rückwärtsprimer	5'- CCTTATTTTAAAGCGGC - 3'	Michel et al. (2003)

2.4.2.1 Durchführung

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bezogen. Ihre Lyophilisate wurden in nuklease-freiem Wasser (Ampuwa, Grünenthal, Aachen, Deutschland) gelöst und 100 µM Stocklösungen angelegt. Die Arbeitslösungen für die Primäramplifikation wurden mit nuklease-freiem Wasser auf 10 µM eingestellt, wohingegen die Konzentration der Arbeitslösungen der Sekundäramplifikation 50 µM war. Die hergestellten Lösungen wurden aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die benötigten Reagenzien für den Mastermixansatz wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermixraum nach Tab. 11a und b in steril verpackten 2 ml SafeLock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Tabelle 11a: Ansatz der *ospA* semi-nested PCR, Primäramplifikation

Komponenten	Konzentration [μM]	Konzentration PCR-Ansatz [μM]	Volumen [μl]
PeqGold HotStart S Mastermix (PeqLab, Erlangen, Deutschland)	2x	1x	25
Primer V1a	10	0,1	0,5
Primer V1b	10	0,1	0,5
Primer R2	10	0,1	0,5
Primer R37	10	0,1	0,5
Nukleasefreies Wasser			18
Template oder Wasser			5
Gesamtvolumen			50

Tabelle 11b: Ansatz der *ospA* semi-nested PCR, Sekundäramplifikation

Komponenten	Konzentration [μM]	Konzentration PCR-Ansatz [μM]	Volumen [μl]
PeqGold HotStart S Mastermix (PeqLab, Erlangen, Deutschland)	2x	1x	25
Primer V3a	50	0,5	0,5
Primer V3b	50	0,5	0,5
Primer R2	50	0,5	0,5
Primer R37	50	0,5	0,5
Nukleasefreies Wasser			18
Template oder Wasser			5
Gesamtvolumen			50

Zusätzlich wurden in jedem PCR-Lauf eine NTC und eine Positivkontrolle (PSig2) mitgeführt. Im Prä-PCR-Bereich wurden unter einer PCR Workstation (PeqLab) jeweils 45 μl des Mastermixes in PCR SingleCaps (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland)

vorgelegt und 5 µl der zu untersuchenden DNA bzw. der Positivkontrolle oder 5 µl Wasser für die NTC hinzu pipettiert.

Die Reaktionsgefäße wurden noch kurz gevortext, zentrifugiert (Galaxy Ministar, VWR, Darmstadt, Deutschland) und dann an einem Eppendorf Thermocycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) die eigentliche PCR nach folgendem Thermoprofil (s. Tab. 12) durchgeführt. Die Sekundäramplifikation erfolgte nach demselben Protokoll.

Tabelle 12: Temperaturprofil der *ospA* semi-nested PCR für beide Amplifikationen

Temperaturprofil	Temperatur [°C]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Aktivierung	95	900	1x
Denaturierung	94	45	45x
Annealing	56	45	
Elongation	72	60	

Nach Beendigung der ersten Amplifikation wurden im Post-PCR-Bereich 45 µl Mastermix des zweiten Mastermix-Ansatzes (s. Tab 3b) in SingleCaps vorgelegt. Als Template diente in der Sekundäramplifikation 5 µl PCR-Produkt aus der ersten Reaktion. 5 µl nukleasefreies Wasser wurden als Template für die NTC eingesetzt. Der Ansatz wurde abermals gevortext, zentrifugiert und dann am Eppendorf Thermocycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) die PCR nach Tab. 11b durchgeführt.

2.4.2.2 Speziesidentifikation

Die Auswertung der *ospA* semi-nested PCR und damit die Speziesidentifikation erfolgte entweder mittels RFLP oder mittels Sequenzierung.

2.4.3 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Diese Technik erlaubt das Produkt der semi-nested PCR zu detektieren und darzustellen. Voraussetzung dafür ist die Anwendung eines DNA-Restriktionsenzym, das spezifisch nur eine bestimmte DNA-Sequenz schneidet. Bei dieser Hydrolyse entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, je nachdem welches Enzym benutzt wird und ob eine bestimmte Borrelie überhaupt diese Sequenz in ihrem Genom besitzt. Kombiniert man mehrere

Restriktionsenzyme im Ansatz miteinander, lassen sich verschiedene *Borrelia*-Spezies identifizieren und differenzieren. Sichtbar gemacht wird das Ergebnis mit Hilfe einer Gelelektrophorese.

Für diese Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, *B. garinii* von *B. bavariensis* zu unterscheiden, falls dies nicht in der *hbb*-PCR gelungen war, und ggf. den Serotyp der beiden *Borrelia*-Spezies zu bestimmen, falls dies ebenfalls nicht in der real-time PCR möglich war.

Als Restriktionsenzyme wurden *Bgl*II, *Hind*III und *Kpn*21 nach Michel et al. (2004) ausgewählt, da sie eine Differenzierung der oben genannten Spezies ermöglichen (s. Tab. 13).

Tabelle 13: RFLP-Muster

Stämme	<i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II	<i>Kpn</i> 21
Pka2	654/144	798	798
PBi, PTrob	798	556/242	798
PHei	654/144	798	549/195/54
TN, PWudII	657/144	801	429/252/120
PRef	427/372	758/43	657/144
Pla	--	798	--

Pka2=*B. burgdorferi* s.s. Serotyp 1; PBi, PTrob=*B. bavariensis* Serotyp 4; PHei=*B. garinii* Serotyp 5; TN, PWudII=*B. garinii* Serotyp 6; PRef=*B. garinii* Serotyp 7; Pla=*B. garinii* Serotyp 8

2.4.3.1 Durchführung

Als Template für den Restriktionsverdau diente das PCR-Produkt aus der Sekundär-Amplifikation der *OspA* semi-nested PCR (s. Kap. 2.4.2). Neben den zu untersuchenden Proben wurden die PCR-Produkte der Stämme PBi, Pla und Pka2 als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Herstellung des Restriktionsansatzes (s. Tab. 14) im Post-PCR Bereich erfolgte in drei getrennten PCR Single-Caps (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland), zu dem jeweils das Enzym *Bgl*II, *Hind*III oder *Kpn*21 zugegeben wurde. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis, um eine vorzeitige Aktivität der Enzyme zu verhindern. Der fertige Ansatz wurde gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden.

Tabelle 14: Ansatz der RFLP-Reaktion

Komponenten	Konzentration	Volumen (μ l)
10x Buffer Tango (Fermentas, St.Leon-Rot, Deutschland)	1	2,0
Enzym	1	0,5
Nukleasefreies Wasser		13,5
Produkt aus semi-nested PCR		4
Gesamtvolumen		20,0

Danach wurden die Reaktionsgefäße mit *Bgl*III und *Hind*III bei 37 °C und das mit *Kpn*21 bei 55 °C über Nacht inkubiert, da diese Temperaturen dem Arbeitsoptimum der eingesetzten Enzyme entsprachen.

2.4.3.2 Auftrennung der Restriktionsfragmente

Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag mit einer prestained Agarose-Gelelektrophorese mittels Nucleid Acid Gel Red Stain (Biotium, Hayward, USA). Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente durch elektrische Spannung in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt: je kleiner ein Stück, desto schneller wandert es im elektrischen Feld.

Zur Herstellung eines 2%-Agarosegels wurden 2 g Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 100 ml Tris-Borat-EDTA(TBE)-Puffer (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in einer Mikrowelle (Siemens, Erlangen, Deutschland) für 5 Minuten bei 900 Watt zum Aufkochen gebracht und nach kurzem Abkühlen auf einem Magnetrührer 10 μ l Nucleid Acid Gel Red Stain (Biotium) zugegeben. Vorsichtig wurde eine Gießform (Peqlab, Erlangen, Deutschland) mit dem flüssigen Gel luftblasenfrei befüllt und ein entsprechender Kamm für die Taschen gesetzt. Nach Aushärten der Gelmasse wurde der Kamm vorsichtig gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer (Uniquip, Freital, Deutschland) eingelegt. Die Kammer wurde mit 1 l TBE-Puffer befüllt. In jedem Lauf wurde ein Größenstandard (OGene Ruler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mitgeführt. 6 μ l PCR-Produkt wurden mit 2 μ l 6x Orange DNA Loading Dye Laufpuffer (Fermentas) gemischt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 60 Minuten bei 130 Volt (V) mittels einem Power PAC 3000 (Biorad, Hercules, USA). Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Fragmente unter einem UV-Detektor

(LTF Labortechnik, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 100 Nanometer (nm) visualisiert und anhand des Größenstandards die Bandengrößen der Positivkontrollen überprüft. Diese wurden wiederum verwendet, um die Genospezies der fraglichen Proben anhand der spezifischen Fragmentgröße zu identifizieren.

2.4.4 Sequenzierung

Das Produkt der semi-nested PCR lässt sich auch durch DNA-Sequenzierung spezifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren zur Identifizierung von Mischinfektionen aus der *hbb* real-time PCR oder sonstigen fraglichen Proben angewendet.

2.4.4.1 Bioanalyser

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation und zur Ermittlung des in die Sequenzierung einzusetzenden DNA-Menge, wurde eine Detektion des PCR-Produkts an einem Agilent 2001 Bioanalyser (Agilent, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Dieser beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und ermöglicht zusätzlich eine Konzentrationsbestimmung. Die Proben und ein mitgeführter Standard bewegen sich in einem elektrischen Feld über eingezogene Mikrokapillaren. Wenn sie eine spezielle Trennkapillare erreicht haben, werden sie je nach Größe aufgeteilt. Mittels eines Fluoreszenz-Detektors werden Laufzeit und Größe unter Zuhilfenahme eines Markers registriert. Der Bioanalyser ermittelt dann aus diesen Daten sowohl ein Elektropherogramm als auch ein gel-like picture. Zur Durchführung wurde ein DNA 1000 Chip benutzt, der für die Detektion von PCR-Produkten bis 1500 Bp ausgelegt ist. Alle benötigten Reagenzien waren im DNA 1000 Kit (Agilent, Böblingen, Deutschland) enthalten. Dabei wurden zunächst 9 µl Gel Marker in die dafür markierte Vertiefung pipettiert. Der Chip wurde in eine Chip-Priming-Station eingelegt und der Plunger der Spritze auf 1 ml eingestellt. Diese wurde verschlossen und unter 1 ml Luftsog für 60 Sekunden die Matrix im Chip verteilt, indem der Plunger nach unten gedrückt wurde. Danach wurden die zwei anderen Gel-Vertiefungen mit 9 µl Gelmatrix gefüllt und anschließend wurden in alle Vertiefungen jeweils 5 µl Marker pipettiert und 1 µl PCR-Produkt oder Ladder (= Standard) in das gekennzeichnete Well hinzugefügt. Im letzten Schritt wurde der Chip mit einem IKA Vortexer (IKA, Staufen, Deutschland) für 60 Sekunden bei 2400 rpm geschüttelt und in den Bioanalyser gelegt. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen Software (2100 expert, Agilent, Böblingen, Deutschland). Die detaillierte

Zusammensetzung der benutzten Reagenzien ist durch Agilent patentrechtlich geschützt. Aufgrund der hohen Sensitivität des Gerätes konnten selbst geringe Konzentrationen bestimmt werden. Für eine Sequenzierung des *OspA*-Gens wurde eine Mindestkonzentration von 5-20 ng/μl benötigt.

2.4.4.2 Aufreinigung des PCR-Produkts für die Sequenzierung

Nach Ermittlung der Konzentration des Produkts, wurde es mit dem Kit QIAQuick (Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt.

Dazu wurde das Produkt in 250 μl PB-Puffer gelöst; hierzu wurden immer 10 μl einer 3 mikromolaren Natrium-Acetat-Lösung gegeben, um den pH-Wert stabil zu halten. Nach Umfüllen in ein Collecting Tube mit Säulchen wurde das gelöste PCR-Produkt bei 13000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule aus dem Tube in ein neues gestellt und 750 μl PE-Puffer hinzu pipettiert. Wiederum wurde 60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und noch einmal ein frisches Tube zentrifugiert, um alle PE-Pufferreste zu entfernen. Im letzten Schritt wurden 20 EB-Puffer auf die Membran der Säule pipettiert und das aufgereinigte PCR-Produkt aus der Säule durch einminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm in Eppendorf Cups eluiert.

2.4.4.3 Sequenzier-PCR

Das aufgereinigte PCR-Produkt diente als Template für die Sequenzier-PCR. Als Primer dienten die inneren Primer der *OspA* semi-nested PCR: V3a und R2. Die benötigten Reagenzien für den Mastermixansatz wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermix-Raum nach Tab. 15 in steril verpackten PCR Tubes 0,5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt. Für jeden Primer wurde jeweils ein Ansatz in einem einzelnen Tube hergestellt. Alle Schritte erfolgten gekühlt, um eine vorzeitige Aktivierung der im Mix enthaltenen Polymerase zu verhindern.

Tabelle 15: Reaktionsansatz der Sequenzier-PCR

Komponenten	Konzentration [μM]	Konzentration PCR-Ansatz [μM]	Volumen [μl]
Big Dye Terminator v1.1 Cycle (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)			4
Primer V3a oder R2	50	0,5	2
5x Puffer	5x	1x	2
Dimethylsulfoxid			0,5
Wasser (HPLC)			6,5
Aufgereinigtes Produkt			X
Gesamtvolumen			20

Im Post-PCR-Bereich wurden je nach gemessener Konzentration des PCR-Produkts die entsprechende Menge zum Mastermix hinzugefügt. Die PCR selber wurde nach folgendem Thermoprofil (s. Tab 16) an einem Primus 96^{plus} (MWG-BioTech, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 16: Temperaturprofil der Sequenzier-PCR

Temperaturprofil	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Aktivierung	96	60	1x
Amplifikation	96	10	35x
	52	5	
	60	240	

2.4.4.4 Zweite Aufreinigung

Das Amplifikat der Sequenzier-PCR wurde nun noch einmal aufgereinigt, um die DNA auszufällen. Dafür wurden nach Vorlage von 16 μl HPLC-Wasser, 4 μl Natriumacetat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 50 μl Ethanol 98% (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 20 μl PCR-Produkt hinzugefügt und für 15 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 50 μl Ethanol 70% gelöst. Wiederum wurde für 5 Minuten bei 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgenommen, ohne das Pellet zu

verletzen. Die offenen Tubes wurden nun für 20 Minuten bei 50 °C in einem Laborofen (Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet; anschließend erfolgte die Resuspendierung in 20 µl HPLC-Wasser.

2.4.4.5 Sequenzieranalyse

Zur eigentlichen Sequenzierung wurden auf einer 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) 10 µl Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vorgelegt und anschließend 5 µl PCR-Produkt hinzupipettiert. Die Sequenzierung wurde an einem HITACHI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktion verlief an 36 cm-Kapillaren unter Verwendung des POP-7 Polymers (Performance Optimized Polymer, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Die Injektionszeit betrug 12 Sekunden bei 1,2 kV. Ein Lauf dauerte ca. 46 Minuten bei einer Laufspannung von 8,5 kV und einer Temperatur von 60 °C.

2.4.4.6 Auswertung

Die Bearbeitung der Sequenzen der einzelnen Primer erfolgte mit der Software SmartGene (SmartGene, Lausanne, Schweiz). Hierzu wurden diese in das Programm im Modus Proofread hochgeladen. Sequenzabschnitte, die mangelhaft amplifiziert worden waren, wurden gelöscht. Die restlichen Abschnitte wurden sorgfältig nach Mismatches abgesucht. Falls einzelne Basen in der Sequenz einem Sequenzpeak nicht entsprachen, wurde an dieser Stelle manuell korrigiert. Die so bearbeitete Sequenz eines einzelnen Primers wurde in die dazugehörige Datenbank geladen und dort nach homologen Sequenzen gesucht. Zur Bestätigung des Ergebnisses wurde die eines anderen Primers herangezogen.

2.5 Optimierung der Borreliendiagnostik

2.5.1 Attomol „*B. burgdorferi* real-time“

Eine Aufgabe des NRZ für Borrelien ist es, die Diagnostik der Lyme-Borreliose zu verbessern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Kit „*B. burgdorferi* real-time“ von Attomol (Bronkow, Deutschland) überprüft. Das Zielgen dieser PCR ist das *fla*-Gen.

Um die Sensitivität dieses Kits zu bestimmen wurden standardisierte Verdünnungsreihen definierter *B. burgdorferi* s.l. Stämme hergestellt. Dazu wurde die Konzentration der DNA-Stocklösungen der Referenzstämmen (s. Tab. 17) mittels Picogreen bestimmt und serielle

Verdünnungsreihen (1:10) entsprechend 100.000 bis 0,1 Genomkopien jeweils in 5 µl hergestellt. In Anlehnung an die European Network of GMO Laboratories (ENGL)-Kriterien zur Validierung einer PCR (Waiblinger et al. 2011) wurden von 100.000 bis 1 Kopie in Dreifachbestimmung und von 0,1 Kopie in Sechsfachbestimmung die Cp-Werte und dazugehörigen Kurven ermittelt (s. Kap. 2.5.1.4).

Tabelle 17: Borreliienstämme für die Sensitivitätstestung

Stamm	<i>B. burgdorferi</i> Spezies	<i>OspA</i> -Serotyp	bezogen von
Pka2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	1	NRZ Borrelien
PGau	<i>B. afzelii</i>	2	NRZ Borrelien
PBr	<i>B. garinii</i>	3	NRZ Borrelien
PBi	<i>B. bavariensis</i>	4	NRZ Borrelien
PHei	<i>B. garinii</i>	5	NRZ Borrelien
TN	<i>B. garinii</i>	6	NRZ Borrelien
PRef	<i>B. garinii</i>	7	NRZ Borrelien
Pla	<i>B. garinii</i>	8	NRZ Borrelien
20047	<i>B. garinii</i>	X	NRZ Borrelien
IP90	<i>B. garinii</i>	X	NRZ Borrelien
PotiB2	<i>B. lusitaniae</i>	Nicht bestimmt	NRZ Borrelien
VS116	<i>B. valaisiana</i>	Nicht bestimmt	NRZ Borrelien
B. jap.	<i>B. japonica</i>	Nicht bestimmt	NRZ Borrelien
PSig2	<i>B. spielmanii</i>	Nicht bestimmt	NRZ Borrelien

2.5.1.1 Herstellung der Verdünnungsreihen

2.5.1.1.1 PicoGreen-Messung

Um die Verdünnungsreihen herzustellen, wurde zunächst die Konzentration der aufgereinigten Borrelien-DNA mit Hilfe des PicoGreen dsDNA Quantification Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Eigenschaft des bei einer Wellenlänge von 480 nm fluoreszierenden PicoGreen-Farbstoffs, selektiv an doppelsträngige Nukleinsäuren zu binden.

Zuerst wurde eine Arbeitslösung des PicoGreen Farbstoff im Verhältnis 1:400 mit 1x TAE- (Tris-Acetat-EDTA) Puffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hergestellt, mit der die Proben anschließend 1:100 verdünnt wurden.

Als Referenzwert wurde eine DNA-Standardverdünnungsreihe (0,016; 0,08; 0,4; 2; 10 und 50 ng/µl) mit der ebenfalls im Kit enthaltenen λ-DNA, die in TAE-Puffer gelöst wurde, hergestellt und gemeinsam mit den PicoGreen-markierten Proben vermessen. Sowohl 100 µl der DNA-Standards als auch der Proben wurden in Doppelbestimmung in eine 96-well Fluorometerplatte (Tecan, Männedorf, Schweiz) vorgelegt und 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Fluorometers Tecan GENios plus reader (Männedorf, Schweiz) bei 520 nm (Anregungswellenlänge 480 nm).

Die Auswertung fand mit der Software Magellan (Tecan, Männedorf, Schweiz) statt. Über die λ -Phagen-DNA Standardkurve konnten anschließend die gemessenen Fluoreszenzwerte der Proben in DNA-Konzentration umgerechnet werden, indem aus den Extinktionswerten der Standards der Mittelwert errechnet und davon der Blindwert abgezogen wurde. Danach wurden diese Werte gegen die gemessene Fluoreszenz aufgetragen und eine Standardkurve erstellt, die eine Bestimmung der Proben-Konzentration in ng/ μ l ermöglichte.

2.5.1.1.2 Herstellung von Verdünnungsreihen aus den vermessenen Proben

Mit den vermessenen Konzentrationen konnten nun Arbeitslösungen mit 100.000 Genomkopien pro 10 μ l hergestellt werden. Unter der Annahme, dass das Genom (Chromosom und Plasmide) von *B. burgdorferi* s.l. 1.521.208 Bp groß ist (Casjens et al. 2000, Fraser et al. 1997), konnte berechnet werden, dass dieses $1,64 \times 10^{-6}$ ng wiegt, denn

$$1.521.208 \text{ Bp} \times 650 \text{ Da/Bp} \times 1,66 \times 10^{-27} \text{ kg/Da} \times 10^{12} \text{ ng/kg} = 1,64 \times 10^{-6} \text{ ng}$$

Darauf konnte man dann das Gewicht von 100.000 Kopien ableiten: 0,032 ng. Um dieses einzustellen, wurden 10 μ l aus den vermessenen Proben mittels Thymus-calf DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) jeweils im entsprechenden Verhältnis in einem steril verpackten LoBind-Tube (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verdünnt. Danach erfolgte ebenfalls mit Thymus-DNA die Herstellung der Verdünnungsstufen jeweils im Verhältnis 1:10. Zur optimalen Vergleichbarkeit wurden die einzelnen Verdünnungen aliquotiert (50 μ l) und bei -80 °C gelagert. Zuletzt wurden alle Reihen mit der *p41* real-time PCR (s. Kap. 2.3.1) als Referenz untersucht und somit der Ct-Wert der Kopienzahl und die Verdünnungsreihe im Ganzen überprüft.

2.5.1.2 Durchführung Attomol-Kit

Das Attomol-Kit „*Borrelia burgdorferi*-Realtime“ bestand aus einem Primer- und Sondengemisch, dem Oligomix, und einem internen Standard, der eine mögliche Inhibierung der PCR anzeigen soll. Deren Sequenzen sind patentrechtlich geschützt und Eigentum der Firma Attomol. Zusätzlich wurde das LightCycler Faststart-DNA-Master HybProbe-Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) benötigt.

Die Reagenzien für den Mastermixansatz wurden bei -20 °C gelagert und unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20.000 g zentrifugiert, um

Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermixraum in steril verpackten Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Für das Roche-Kit wurden zunächst 60 μl des FastStart Reaction Mix HybProbe 10x Conc. zum FastStart Enzyme pipettiert und gut gevortext. Für das Attomol-Kit wurden 24 μl des internen Standards zum Oligomix pipettiert und ebenfalls gut gevortext. Die Zusammensetzung des eigentlichen Mastermix-Ansatzes ist in Tab. 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Reaktionsansatz der Attomol real-time PCR

Komponenten	Volumen [μl]
Attomol Prämix	4,4
Roche Mix	1,1
Template, Extraktionskontrolle oder Wasser für NTC	5,0
Gesamtvolumen	10,5

In jedem PCR-Lauf wurden eine EK und eine NTC mitgeführt. Im Prä-PCR-Bereich wurden unter einer PCR Workstation (PeqLab, Erlangen, Deutschland) jeweils 5 μl des Mastermixes in LightCycler Kapillaren (Roche, Mannheim, Deutschland) vorgelegt. Die Kapillaren befanden sich dabei in einem Kühlblock. Sodann wurden 5 μl der zu untersuchenden DNA bzw. der Extraktionskontrolle oder 5 μl Wasser für die NTC hinzupipettiert.

Die Extraktionskontrolle erlaubt den Ausschluss von Kontaminationen während des Isolationsvorgangs, wohingegen die NTC auch die Reinheit der in der PCR verwendeten Komponenten überprüft. Die Kapillaren wurden abschließend sorgfältig mit einem Deckel verschlossen und bei 1000 g für 15 Sekunden zentrifugiert (LC Carousel Centrifuge 2.0, Roche, Mannheim, Deutschland). Die Untersuchungen wurden mit einem LightCycler 2.0 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 19: Temperaturprofil der Attomol real-time PCR

Temperaturprofil	Temperatur [°C]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Aktivierung	95	420	1x
Denaturierung	95	4	45x
Annealing	62	25	
Elongation	72	15	
Kühlen	40	20	1x

2.5.1.3 Bestimmung der Nachweisgrenze

Die Auswertung erfolgte mit der Software LightCycler 4.05 (Roche, Mannheim, Deutschland) im Modus Absolute Quantification. Eine Colour Compensation für die Kanäle 530 nm, 640 nm und 705 nm wurde hinzugeschaltet, um den Crosstalk zu minimieren. Dieser entsteht dadurch, dass sich die Spektren der beiden Farbstoffe überlappen. Zuerst wurden im FAM-Kanal mit der Kombination 640/530 die Kurven und die Cp der Proben betrachtet, wobei darauf geachtet wurde, ob die Mastermixe frei von Kontaminationen waren. Danach wurde im Kanal mit der Kombination 705/530 überprüft, ob die PCR-Reaktion inhibiert war. Eine Inhibition lag vor, wenn in diesem Kanal 100.000 Kopien nicht amplifiziert werden konnten. Sie kann durch verschiedene Bestandteile der zu untersuchenden Matrix entstehen und das Ergebnis falsch-negativ verfälschen. Erst dann wurde ausgewertet, bis zu welcher Kopienzahl das Kit Borrelien erkannte. Die letzte Stufe in der Verdünnungsreihe, in der alle Proben noch mehrfach einen Cp aufwiesen, wurde als Limit of detection (LOD) festgelegt.

2.5.1.4 Bestimmung der Spezifität

Um die Spezifität des Attomol-Kits zu bestimmen, wurden standardisierte Verdünnungsreihen von Spirochäten, nämlich 18 verschiedener Subspezies von Leptospiren (s. Tab. 20) sowie der Rückfallfieber-Borrelien *B. duttoni*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. miyamoto* und der apathogenen Treponeme *Treponema phagedenis* verwendet.

Tabelle 20: Liste der Leptospirenstämme zur Spezifitätstestung des Attomol-Kits (freundlicherweise durch Dr. Raschel, LGL Bayern, zur Verfügung gestellt)

Kürzel	Genospezies	Stamm	Serovar	Serogruppe
L1	<i>L. interrogans</i>	Ballico	Australis	Australis
L2	<i>L. interrogans</i>	Jez Bratislava	Bratislava	Australis
L3	<i>L. interrogans</i>	Akiyami A	Autumnalis	Autumnalis
L4	<i>L. borgpeter-senii</i>	Mus 127	Ballum	Ballum
L5	<i>L. interrogans</i>	Swart	Bataviae	Bataviae
L6	<i>L. interrogans</i>	Hond Utrecht IV	Canicola	Canicola
L7	<i>L. kirschneri</i>	Moskva V	Grippytyphosa	Grippytyphosa
L8	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
L9	<i>L. interrogans</i>	M20	Copenhageni	Iceterohaemorrhagiae
L10	<i>L. interrogans</i>	Icetero I	Iceterohaemorrhagiae	Iceterohaemorrhagiae
L11	<i>L. borgpetersenii</i>	Veldrat Batavia 46	Javanica	Javanica
L12	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	Pomona
L13	<i>L. interrogans</i>	Salinem	Pyrogenes	Pyrogenes
L14	<i>L. interrogans</i>	Hardjoprtnjo	Hardjo	Sejroe
L15	<i>L. borgpetersenii</i>	M84	Sejroe	Sejroe
L16	<i>L. interrogans</i>	Mus 24	Saxkoebing	Sejroe
L17	<i>L. borgpetersenii</i>	Perepelitsin	Tarassovi	Tarassovi
L18	<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I	Semarang

Alle Stämme waren auf 10.000 Kopien/5 µl eingestellt. Der Cp wurde in Dreifachbestimmung ermittelt. War hier eine Probe dreimal positiv getestet, wurde von dieser Probe eine komplette Verdünnungsreihe hergestellt und ausgetestet. Proben, die dreimal negativ getestet wurden, wurden als negativ gewertet. Die Durchführung und die Auswertung erfolgten wie in Kap. 2.5.1.2 beschrieben.

2.5.2 Validierung eines neuen Duplex real-time PCR-Ansatzes

Die Genospezies *B. lusitaniae* ist in Deutschland selten (Fingerle et al. 2008) und eine Humanpathogenität ist noch nicht abschließend gesichert (Collares-Pereira et al. 2004). Da mit der bisherigen *p41*-basierten PCR *B. lusitaniae* nicht nachweisbar ist, war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit, die am NRZ angewendeten Screening-PCR dahingehend zu verbessern, dass *B. lusitaniae* ebenfalls detektiert werden kann, um künftig für forschungs- und routinediagnostische Anwendungen alle in Deutschland vorkommenden Genospezies zu erfassen.

Dafür sollte ein Duplex-Ansatz designt werden. Zum Protokoll der bereits etablierten *p41*-PCR wurden Primer und eine Sonde, deren Zielsequenz speziesspezifisch das *OspA*-Gen von *B. lusitaniae* erfasst, hinzugefügt. Diese wurde in Kooperation mit der Forschungs- und Entwicklungsabteilung des LGL Bayern (Dr. Huber) entwickelt. Dazu wurde ein Alignment von *OspA*-Sequenzen aller relevanten *B. burgdorferi* s.l.-Spezies und von *B. lusitaniae* mittels NCBI Genbank hergestellt. Ein *B. lusitaniae* spezifischer Abschnitt des Gens wurde

ausgewählt und mittels FAST-PCR (www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm) die in Tab. 21 aufgeführten *B. lusitaniae*-spezifischen Primer und Sonden ermittelt.

Tabelle 21: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde zur Detektion von *B. lusitaniae*

Bezeichnung	Sequenz
OspA_for2, Vorwärtsprimer	5'- AATATTTATTgggAATAAgTCTAA - 3'
OspA_rev2, Rückwärtsprimer	5'- CACCAgACAACCTCTACTgA - 3'
OspA_TM_Cy5, Sonde	5'- Cy5-CTAATAgCATgTAAgCAAAATgCTggCg--BBQ

2.5.2.1 Optimierung

Für die designten Primer und die Sonde wurden zunächst an einem Eppendorf Thermocycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einer Gradienten-PCR die optimale Annealingtemperatur für einen *OspA*-Singleplex-Ansatz bestimmt. Dazu wurde der Referenzstamm PotiB2 verwendet und ein Temperaturrange von 52, 54, 56, 58 und 60 °C für das Annealing getestet. Des Weiteren wurde die optimale Primer- und Sondenkonzentration für die *OspA*-PCR ausgetitriert. Die Spezifität der *OspA*-Singleplex-PCR wurde an verschiedenen Borrelienspezies überprüft (siehe Tabelle 17). Die spezifische Produktgröße des Amplifikats wurde mittels Bioanalyzer überprüft (siehe Kapitel 2.4.4.1).

Ebenfalls wurde für die in den Duplex-Ansatz einzubauende *p41*-PCR eine Gradienten-PCR (52, 54, 56, 58, 60 °C) zur Abschätzung der Temperaturrobustheit der PCR ermittelt. Hierfür wurde der Referenzstamm IP90 (*B. garinii*) verwendet. Die Durchführung der *p41*-Singleplex-PCR erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben.

2.5.2.2 Durchführung

Der optimierte *OspA*-Singleplex-Ansatz wurde nun mit der bestehenden *p41*-PCR kombiniert. Dazu wurde die Mastermix-Zusammensetzung dahingehend optimiert, dass ein Multiplex-tauglicher Ready-to-use Mastermix verwendet wurde (Quantitect NoRox, Qiagen, Hilden, Deutschland). Abermals wurden Primer und Sondenkonzentration im Duplex-Ansatz individuell für jedes System titriert.

Zudem wurde ein weiterer Amplifikationsschritt (three-step-PCR) eingefügt, um die Sensitivität des Systems zu erhöhen.

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma TIB Molbio (Berlin, Deutschland) bezogen. Ihre Lyophilisate wurden in nuklease-freiem Wasser (Ampuwa, Grünenthal, Aachen, Deutschland) gelöst und 100 μM Stocklösungen angelegt. Die Arbeitslösungen wurden mit nuklease-freiem Wasser auf 10 μM bzw. 20 μM eingestellt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Die benötigten Reagenzien für den Mastermixansatz wurden unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, gevortext und für zehn Sekunden bei 20000 g zentrifugiert, um Rückstände am Deckel zu vermeiden. Für das Pipettieren wurden ausschließlich gestopfte PCR-Spitzen (ep Tips Dualfilter PCR clean, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Für jeden PCR-Lauf wurde die benötigte Menge an Mastermix zzgl. zehn Prozent für den Pipettierfehler berechnet und im Mastermixraum in steril verpackten Safe-Lock Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) angesetzt.

Zusätzlich wurde in jedem PCR-Lauf eine Non-template control mitgeführt. Im Prä-PCR-Bereich wurden unter einer PCR Workstation (PiqLab, Erlangen, Deutschland) jeweils 20 μl des Mastermixes auf einer 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vorgelegt und 5 μl der zu untersuchenden DNA oder 5 μl Wasser für die NTC hinzu pipettiert. Als Template dienten die Verdünnungsreihen von PotiB2 und IP90.

Die 96-Well-Platte wurde abschließend sorgfältig mit einem optical film (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verschlossen und bei 1000 g für eine Minute zentrifugiert (Universal 320, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Die Untersuchungen selber wurden an einem MX 3005P Stratagene von Agilent (Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Der FAM- und der Cy5-Kanal wurden als Detektionskanäle ausgewählt und lagen achtfach (FAM) bzw. einfach (Cy5) verstärkt vor.

2.5.3 Triplex-Ansatz

Zusätzlich wurde versucht, zum etablierten Duplexsystem eine interne Inhibitionskontrolle zu integrieren. Dazu wurde ein 125 Bp langes Fragment des ntb2-Plasmids (*Nicotiana tabacum*) mit einem spezifischen Primer/Sonden-System (ntb2-F; ntb2-R und ntb2-Sonde) amplifiziert (Anderson et al. 2010). Das Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Dr. Huber, LGL Bayern, zur Verfügung gestellt. Primer und Sondensequenzen sind Tabelle 22 zu entnehmen.

Tabelle 22: Spezifische Primer und Sonden des ntb2-Systems

Bezeichnung	Sequenz	Referenz
ntb2-AW-fw-2, Vorwärtsprimer	5'- ACCACAATgCCAgAgTgACAAC – 3'	Anderson et al. (2010)
ntb2-AW-re-2, Rückwärtsprimer	5'- TACCTggTCTCCAgCTTTCAGTT – 3'	Anderson et al. (2010)
ntb2-Sonde	5'- HEX*-CACgCgCATgAAgTTAggggACCA--BBQ - 3'	Anderson et al. (2010)

*HEX=Hexachlorfluoreszein

Die Primer und Sondenkonzentrationen wurden aus der Publikation übernommen. Dieses System dient als interne Inhibitionskontrolle und ermöglicht das Erkennen von Inhibitoren im PCR-Ansatz. Somit können falsch negative Ergebnisse verhindert werden. Das Thermoprofil sowie die Durchführung wurden von der Duplex-PCR übernommen.

2.5.4 Auswertung

Nach Beendigung eines Laufs fand die Auswertung mit der Software MxPro der Firma Agilent (Böblingen, Deutschland) statt. Hierbei wurde im Quantitative PCR-Modus für den Duplex-Ansatz der FAM- bzw. der Cy5-Kanal ausgewählt, für den Triplex-Ansatz zusätzlich der HEX-Kanal. Der Threshold für den FAM-Kanal wurde auf 1000, für Cy5 auf 200 und für HEX ebenfalls auf 200 Fluoreszenz-Einheiten gesetzt. Dies entsprach den optimalen Fluoreszenzbereichen der Sonden. Vor der Auswertung der eigentlichen Proben wurden die oben genannten Kontrollen auf Plausibilität geprüft. Die NTC musste dabei negativ sein.

2.5.5 LOD-Bestimmung

Anhand der Verdünnungsreihen wurde das LOD für die Singleplex-PCRs und für die Duplex-PCR bestimmt. Das LOD war definiert als die Verdünnungsstufe, bei der alle drei Bestimmungen noch einen messbaren Ct aufwiesen.

Die Sensitivitäten der etablierten Duplex-PCR wurden im selben Lauf mit den *ospA*- bzw. *p41*-Singleplex-Ansätzen an standardisierten Verdünnungsreihen verglichen. Für das *B. lusitaniae*-spezifische *ospA*-System wurde eine Verdünnungsreihe von PotiB2 und für das *p41*-System von IP90 verwendet. Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte wie in Kapitel 2.5.1.1 beschrieben. Verdünnungsstufen umfassten 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10 und 1 Genomkopie. Jede davon wurde in Triplikaten analysiert. Die Verdünnungsstufe mit

0.1 Kopien wurde sechsmal in jedem Lauf bestimmt, um die Reinheit der Verdünnungsreihe zu verifizieren.

Bei der Auswertung der Triplex-PCR wurde genauso vorgegangen.

2.5.6 Effizienzberechnung

Nach der LOD-Bestimmung für beide Systeme wurde die Effizienz, die Steigung (slope) der Standardgeraden und das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Dies erlaubte einen besseren Vergleich der Duplex- und Triplex-PCR untereinander als auch einen Vergleich mit kommerziellen Kits.

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Bearbeitung der Daten wurde mit MS Excel und SPSS 18 durchgeführt. Die statistische Analyse der Infektionsraten erfolgte über den Chi-Quadrat-Test (χ^2) nach Pearson, bei niedrigen Fallzahlen nach Fisher exakt. Ein Unterschied wurde als statistisch signifikant bewertet, falls der p-Wert kleiner als 0,05 war.

3. Ergebnisse

3.1 Abflagen der Zecken

Insgesamt wurden im Jahr 2011 von März bis November 4513 Zecken (ausschließlich *Ixodes ricinus*) aller Entwicklungsstadien an den verschiedenen Standorten gesammelt. Von den Zecken waren 1868 adult, 2644 waren Nymphen und eine im Larvenstadium. Auf Lindau (Li) entfielen 117 Zecken, auf den Englischen Garten (EG) 498, auf Oberschleißheim (OSH) 1365 und auf den Bayerischen Wald (BW) 2533, davon nur 12 im Nationalpark (NPBW) und der Rest in den angrenzenden Regionen. Eine genaue Übersicht ist in Tab. 23 dargestellt.

Tabelle 23: Verteilung der Zecken auf die unterschiedlichen Sammelorte im Jahr 2011

Sammelort	Larven	Nymphen	Adulte	
			männlich	weiblich
EG	0	115	203	170
OSH	0	314	591	460
Li	0	83	16	18
BW	1	2124	187	209
NPBW	0	8	1	3

Im Englischen Garten und Oberschleißheim wurde zweimal im Monat abgeflagt, im Bayerischen Wald und in Lindau nur einmal im Monat. Das Sammeln fand in den frühen Abendstunden, meist bis in die Dämmerung hinein, statt.

3.2 Zeckenaktivität

Die Aktivität (Anzahl an Zecken/100m²) variierte von 0/100m² bis 393/100m². Die niedrigste Zeckenaktivität mit 0 für einzelne Sammelstellen wurde im NPBW beobachtet. In den angrenzenden Regionen im Bayerwald, als auch an den anderen Sammelgebieten war sie deutlich höher (s. Anhang 2).

Die Zeckenaktivität zeigte in allen Sammelgebieten einen charakteristischen Verlauf. Im Frühjahr wurden nur sehr wenige Zecken abgeflagt, während ab Mai die Aktivität sprunghaft anstieg. Nach einem weiteren Hoch im Juni fiel sie allmählich ab, um im Spätherbst wieder gegen Null zu tendieren (Abb. 6).

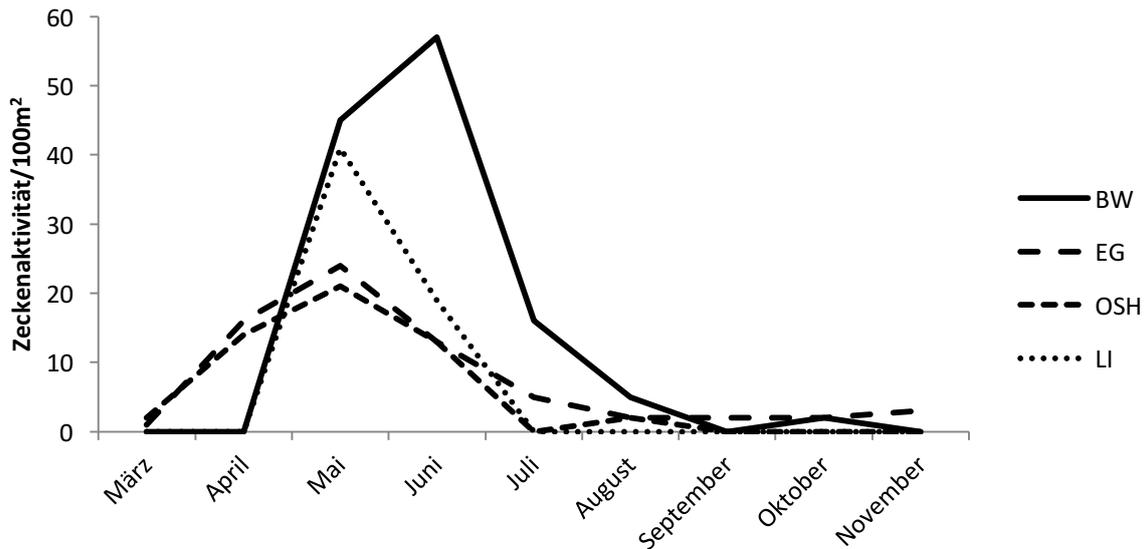


Abbildung 6: Darstellung der mittleren Zeckenaktivität aller Sammelgebiete im Jahr 2011. BW umfasst alle einzelnen Sammelgebiete, auch im Nationalpark. Für genaue Daten s. Anhang 2. BW=Bayerischer Wald, EG=Englischer Garten, OSH=Oberschleißheim, Li=Lindau

3.3 Zeckenaktivität und Klima

Ein Hauptziel des VICCI-Projektes war es, die Abhängigkeit der Zeckenaktivität von den klimatischen Verhältnissen am Abflaggort zu evaluieren. Dazu wurden beim Deutschen Wetterdienst die Wetterdaten (Wetterlage, Temperatur, Luftfeuchtigkeit) der einzelnen Sammeltage angefordert.

Die Auswertung der Daten entsprach ziemlich genau den Ergebnissen, die durch die Data-Logger gewonnen werden konnten. Die mikroklimatischen Bedingungen konnten somit am Abflaggort relativ genau bestimmt werden. Für den Bayerischen Wald lagen zudem umfangreiche Daten über Mikroklima, Vegetation, Beschirmungsgrad und Vogelverteilung vor.

3.3.1 Zeckenaktivität und Temperatur

Zecken konnten in einem Temperaturbereich von 10,5 °C bis 27 °C gefangen werden, die Mehrheit allerdings bei einer Temperatur über 18 °C. Interessanterweise wurden aber auch einmal bei nur 11,6 °C 396 Zecken auf vier Plots à 100 m² gesammelt (04.05.2011 in Oberschleißheim). Grundsätzlich waren die Temperaturen aber so weit gestreut, dass keine sichere Aussage getroffen werden konnte, ab welcher Temperatur die Zeckenaktivität signifikant zunimmt (vgl. Anhang 4 und Abb. 7). Wärmere Temperaturen scheinen

vorteilhaft, stellen aber keine unmittelbare Voraussetzung dar, da z.B. im August trotz der Wärme in allen Gebieten nur eine niedrige Aktivität festgestellt werden konnte.

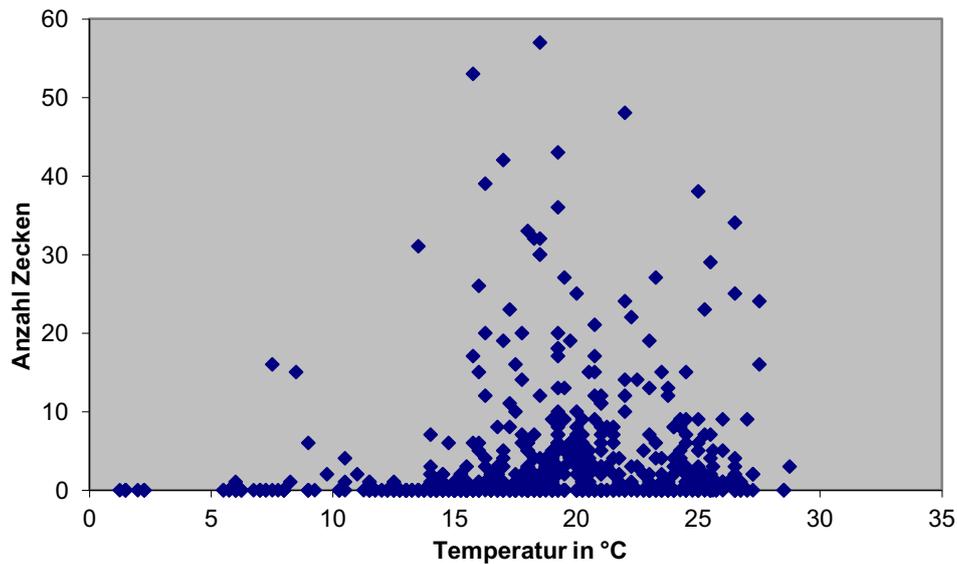


Abbildung 7: Darstellung der Zeckenanzahl in Abhängigkeit von der lokalen Temperatur.

3.3.2 Zeckenaktivität und Luftfeuchtigkeit

Für die Luftfeuchtigkeit zeigte sich ein ähnliches Bild. Zecken konnten in einem Bereich von 35% bis 89% gefangen werden. Sowohl in einem Bereich von 50% bis 90% als auch in einem Bereich von 35% bis 50% konnte eine hohe Zeckenaktivität beobachtet werden, wobei sie im erstgenannten Bereich leicht überwog. So muss festgehalten werden, dass eine hohe Luftfeuchtigkeit nicht mit hoher Zeckenaktivität korreliert war. Vgl. hierzu auch Anhang 3 und Abb. 8.

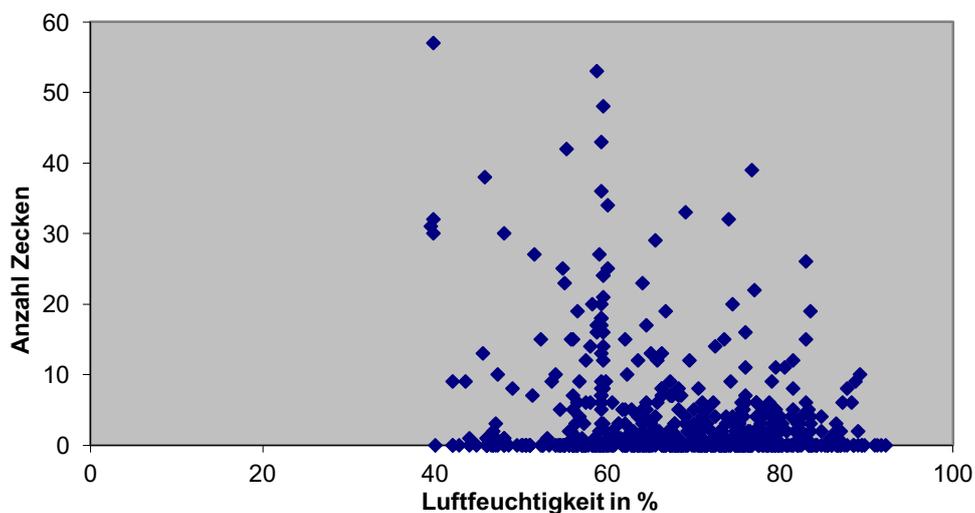


Abbildung 8: Darstellung der Zeckenanzahl in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit.

3.3.3 Zeckenaktivität und Beschattung

An allen Sammelorten wurde die Beschattung geschätzt und dokumentiert, um den Beschattungsgrad in seinem Verhalten auf die Zeckenaktivität zu betrachten. Als Ergebnis zeigte sich, dass ein Großteil der Zecken bei hohen Beschattungsgraden, d.h. >80 %, gesammelt wurde. Nichtsdestotrotz konnte an einigen Sammelorten auch bei niedrigen Beschattungsgraden eine relativ hohe Zeckenaktivität beobachtet werden. Die Zeckenaktivität war an Beprobungsflächen mit hoher Beschattung aber signifikant erhöht ($p=0,002$).

3.4 Zeckenaktivität und Höhe

Im Bayerischen Wald lagen die Sammelorte entlang eines Höhengradienten (s. Kap. 2.1). Ab dem Übergang von der land- und forstwirtschaftlich genutzten Region Bayerwald in den NPBW auf etwa 630 m wurde an den ausgewählten Beprobungsstellen keine oder eine nur sehr geringe Zeckenaktivität bis in eine Höhe von 1360 m beobachtet (s. Abb. 9). Der höchste Punkt, an dem noch eine Zecke gefunden wurde, lag bei 1100 m. Zusammenfassend konnte kein Effekt der Höhe auf die Zeckenaktivität ausgemacht werden; der rasche Rückgang ab etwa 700 m kann mit dem Übergang in den NPBW erklärt werden. Anhand der hier gefangenen Zecken konnte kein Einfluss der Höhe dokumentiert werden.

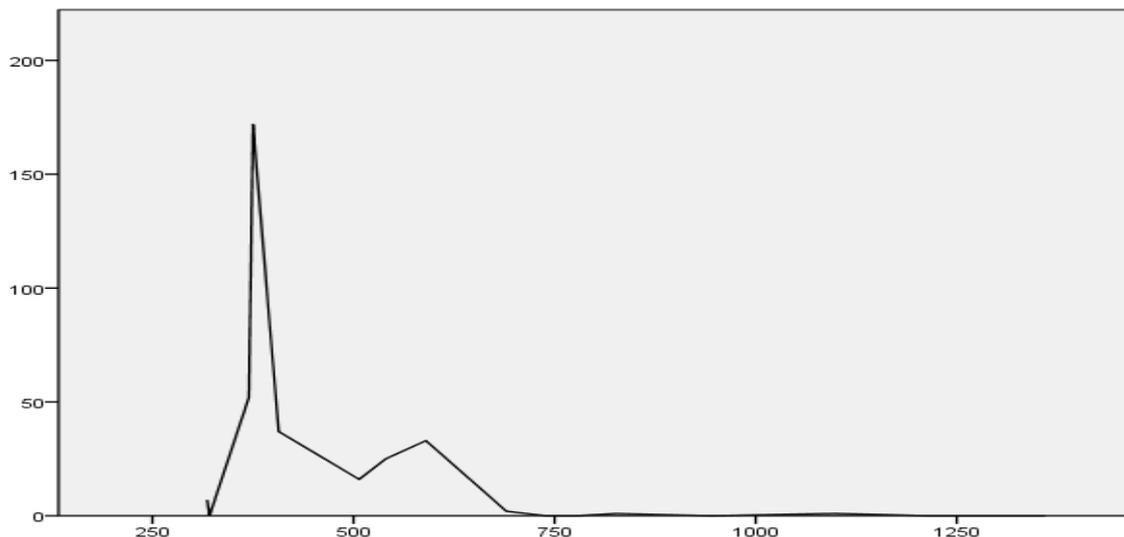


Abbildung 9: Darstellung des Einflusses von Höhe auf die Zeckenaktivität. Auf der x-Achse ist die Höhe in Meter über Normalnull (m ü. NN) aufgetragen, auf der y-Achse die mittlere Zeckenaktivität/100m².

3.5 Zeckenaktivität und Vegetation

Als weiteren Parameter mit einem möglichen Einfluss auf die Zeckenaktivität wurde die Vegetation an den einzelnen Sammelorten herangezogen. Es wurde versucht, bei möglichst vielen Sammelorten unterschiedliche Habitate zu beproben. So wurden Waldgebiete mit niedrigem Unterwuchs (Heidelbeeren, Waldmeister, Immergrün bedeckt mit Laub) gegen Wegränder mit krautiger oder grasartiger Bepflanzung verglichen. Im Englischen Garten waren es vorwiegend weite Wiesenränder mit angrenzenden Baumbestand; die Flächen wurden unregelmäßig von Schafen abgeweidet. Ein signifikanter Unterschied in der Zeckenaktivität konnte zwischen den Vegetationsarten nicht festgestellt werden.

3.6 Zeckenaktivität und Vogelbestand

Die durch die Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald bereitgestellten Daten ermöglichten es zudem, einen potentiellen Zusammenhang zwischen Zeckenaktivität bzw. Borrelienprävalenz und Vogelbestand zu untersuchen. So ist weithin gesichert, dass v. a. *B. garinii* und *B. valaisiana* mit Vögeln assoziiert sind (Kurtenbach et al. 1998, Hanincová K et al. 2003b, Kjelland et al. 2010). Die Auswertung der Daten zeigte, dass an allen Sammelorten im Bayerischen Wald Vögel verzeichnet werden konnten. Im Nationalpark waren es allerdings deutlich weniger als außerhalb davon. Diese Tatsache könnte mit ein Grund für die äußerst niedrige Zeckenaktivität im NPBW gewesen sein.

3.7 DNA-Extraktion

Von allen gefangenen Zecken wurde mittels Biosprint die DNA extrahiert. Diese Methode erlaubte es, hochwertige genomische DNA zu gewinnen. Um den Erfolg der Extraktion zu überprüfen, wurde von jeweils zehn zufälligen Stichproben pro 96-well Platte die DNA-Konzentration mittels PicoGreen (s. Kap. 2.5.1.1.1) ermittelt. Die Stichproben wiesen alle eine ausreichende Konzentration auf. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass die Ergebnisse der PCR nicht durch zu wenig DNA verfälscht werden konnten.

3.8 *p41* real-time PCR

Die isolierte DNA aller Proben wurde mit dieser Methode untersucht. Die automatisiert am MX 3005P Stratagene durchgeführte *p41* real-time PCR erlaubte die Zecken-DNA zügig und problemlos zu untersuchen. Mit diesem Ansatz konnten fast alle humanpathogenen Spezies

detektiert werden: *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*, aber auch andere Vertreter des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes, wie etwa *B. valasiana*, *B. bisetii* oder *B. kurtenbachii*. Nicht erkannt wurden *B. hermsii*, *B. duttoni* sowie Spezies der Gattung *Trepenoma* und *Leptospira*.

Abb. 10 zeigt typische Amplifikationskurven eines *p41* real-time PCR-Laufs am Stratagene Mx30005.

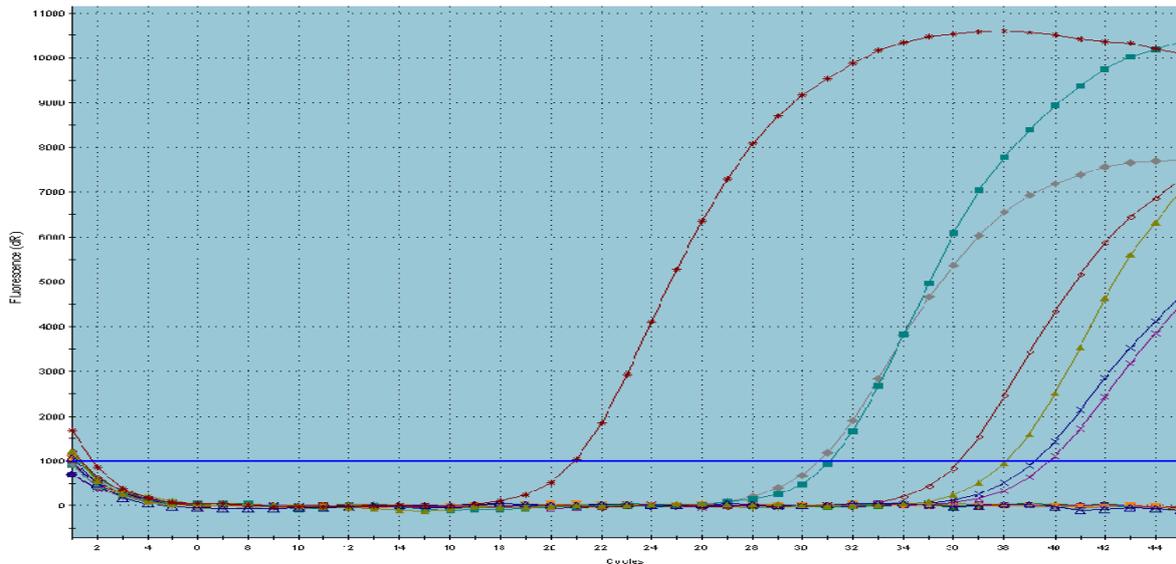


Abbildung 10: Amplifikationskurven einer *p41* real-time PCR. Auf der x-Achse ist die Zyklenzahl dargestellt, auf der y-Achse die Fluoreszenzintensität des FAM-Kanals. Die blaue waagrechte Linie stellt den Threshold bei 1000 Fluoreszenzeinheiten dar. Die rote Kurve links ist die PK und stark positiv. Alle anderen ansteigenden Kurven sind positive Zeckenisolate.

Die Ergebnisse der *p41* real-time PCR erlaubten die Infektionsrate der Zecken mit Borrelien zu bestimmen. Diese fand Eingang in die Prävalenzstudie im Rahmen des VICCI-Projekts.

3.9 *hbb* real-time PCR

Jede Probe, die in der *p41* real-time PCR mit einem Ct < 40 positiv war, wurde im zweiten Schritt zur Speziesdifferenzierung mit der *hbb* real-time PCR untersucht. Hier konnten die verschiedenen Borrelienspezies aufgrund unterschiedlicher Schmelzpunkte unterschieden werden.

Abb. 11 zeigt die typischen Schmelzkurven der Positivkontrollen in der *hbb* real-time PCR.

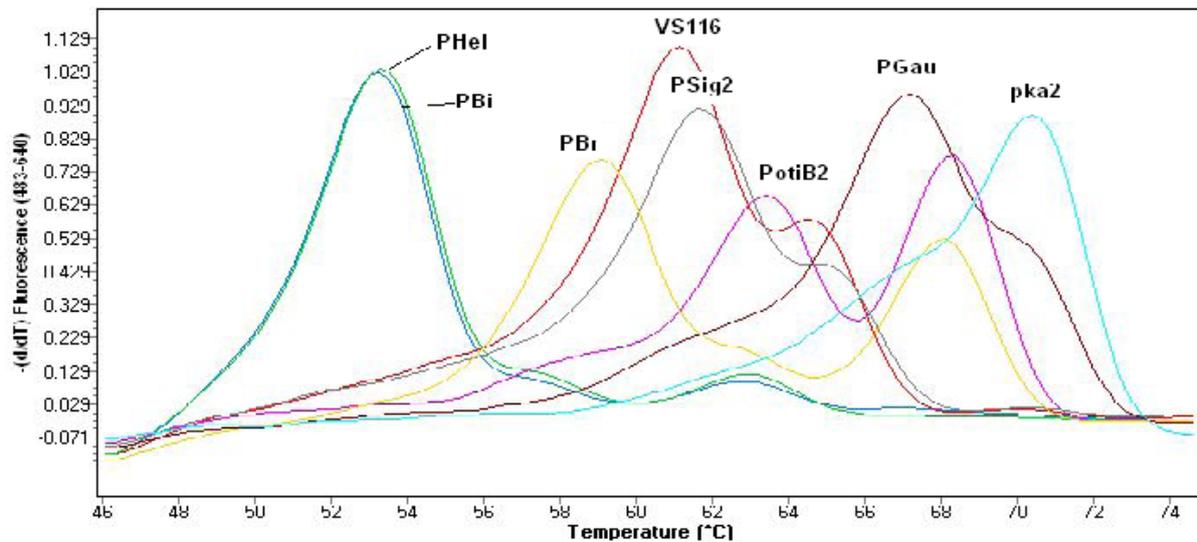


Abbildung 11: Schmelzkurven der Positivkontrollen in der *hbb* real-time PCR. Auf der x-Achse ist die Temperatur aufgetragen, auf der y-Achse die Fluoreszenz. Pka2=*B. burgdorferi* s.s. Serotyp 1; PGau=*B. afzelii* Serotyp 2; PBi=*B. bavariensis* Serotyp 4; PHei=*B. garinii* Serotyp 5; PSig2=*B. spielmanii*; VS116=*B. valaisiana*; PotiB2=*B. lusitanae*

Bei Mischinfektionen entspricht die Kurve einer Zusammensetzung der einzelnen charakteristischen Schmelzkurven (s. Abb. 12).

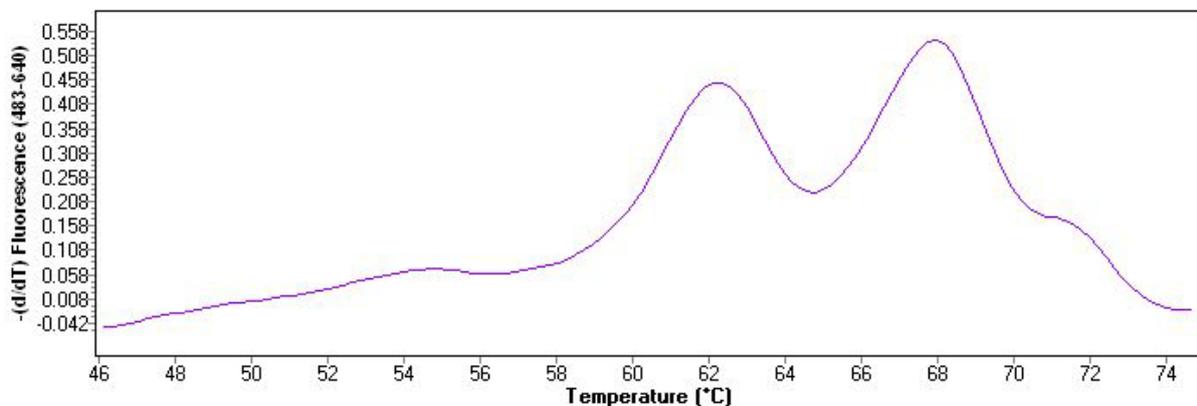


Abbildung 12: Beispiel für eine Mischinfektion mit *B. valaisiana* (VS116) und *B. afzelii* (PGau). Schmelzpunkte bei 62 °C bzw. 68 °C.

Eine Unterscheidung der verschiedenen Serotypen von *B. garinii* war nur bei Serotyp 3 möglich, alle anderen Typen wurden unter *B. garinii* ohne Serotyp subsumiert. Einschränkungen gab es auch in manchen Läufen bei der Differenzierung von *B. garinii* und *B. bavariensis*. Aufgrund des fast identischen T_m gelang sie nicht immer (s. Abb. 10).

Diese Proben mussten mittels RFLP oder Sequenzierung bestätigt werden. Dasselbe Vorgehen wurde bei Schmelzkurven angewendet, die offensichtlich Mehrfachinfektionen mit

verschiedenen *Borrelia*-Spezies waren oder Peaks enthielten, die nicht sicher identifiziert werden konnten.

In der Literatur (Portnoi et al. 2006, Ferdin et al. 2010) wird immer wieder darauf hingewiesen, dass die *hbb* real-time PCR Probleme bei der Identifizierung von *B. spielmanii* und *B. valaisiana* aufweisen würde. Zudem gab es in dieser Arbeit das oben genannte Problem mit den Genospezies *B. garinii* und *B. bavariensis*. Um die Ergebnisse der Prävalenzstudie abzusichern, wurde beschlossen, mehrere Blindversuche mit den vier genannten Genospezies durchzuführen, um in diesem Punkt Sicherheit zu erlangen.

Als geblindete Proben wurden solche ausgewählt, die von einem anderen Sammelort (Grafrath) stammten und deren Spezies mittels RFLP bestimmt worden war. Insgesamt wurden dafür 65 Proben ausgewählt (31 *B. garinii*, 6 *B. bavariensis*, 7 *B. spielmanii* und 21 *B. valaisiana*).

Die Ergebnisse stellten sich wie folgt dar: Von den 65 untersuchten Proben wurden 31 (48%) richtig erkannt, 34 (52%) dagegen falsch. Für die einzelnen Genospezies zeigten sich unterschiedliche Resultate. Von den sechs *B. bavariensis* wurde nur eine (17%) richtig bewertet, fünf (83%) falsch; von den 21 *B. valaisiana* dagegen elf (52%) richtig und zehn (48%) falsch. Die sieben *B. spielmanii* wurden in drei Fällen (43%) richtig erkannt und in vier (57%) Fällen nicht. Die 31 *B. garinii* schließlich wurden sechzehnmal (52%) richtig und fünfzehnmal (48%) falsch erkannt.

Zudem wurde versucht durch die Untersuchung von *p41*-negativen Proben die Ergebnisse der *hbb* real-time PCR weiter abzusichern. Ziel war es, die Rate an möglichen falsch-positiven Ergebnissen zu erkennen. Dafür wurden 266 Proben von allen Sammelorten untersucht, von denen vier (1,5%) positiv waren. Der Rest (98,5%) war negativ. Damit lag die Sensitivität der *p41*-PCR in einem sehr hohen Bereich.

3.10 *ospA* semi-nested PCR

Diese konventionelle PCR mit anschließender Auswertung mittels RFLP oder Sequenzierung wurde eingesetzt, um auffällige oder schwer zu differenzierende Proben doch auf Speziesebene zu definieren. Detektiert werden konnten *B. afzelii*, *B. burgdorferi* ss., alle *B. garinii* *OspA*-Typen, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, und *B. bavariensis*. Nicht erfasst wurden mit dieser PCR Verwandte des Komplexes wie *B. hermsii* und *B. duttoni*, sowie *Leptospira* und *Treponema* (Michel et al. 2004).

Insgesamt gab es 15 Proben mit der Fragestellung Mehrfachinfektion und 16 nicht sicher identifizierbare Proben. Weitere 23 Proben wurden mit dieser PCR untersucht, um *B. garinii*

von *B. bavariensis* mittels RFLP zu unterscheiden. Schließlich wurden 26 Proben zur Absicherung der Ergebnisse der Prävalenzstudie untersucht.

Bei den Mischinfektionen konnten in keinem Fall die eigentlich zu erwartenden Doppelbanden detektiert werden, sondern in drei Fällen nur eine einzelne Bande, in den restlichen Fällen gar keine Bande. Von den nicht sicher identifizierbaren Proben wiesen vier ausreichende Banden auf, um sie weiter zu untersuchen. Von den Proben für die Prävalenzstudie konnten nur elf davon amplifiziert werden.

3.10.1 Bioanalyzer

Bevor die PCR-Produkte der *ospA* semi-nested PCR entweder mit RFLP oder einer Sequenzierung untersucht werden konnten, mussten eine erfolgreiche Amplifikation und ihre Konzentration mittels Bioanalyzer bestimmt werden. Dieses Gerät erzeugt gel-like pictures, die konventionellen Gelbildern ähneln. In Abb. 13 ist zur Verdeutlichung dieses Sachverhalts ein gel-like picture gezeigt.

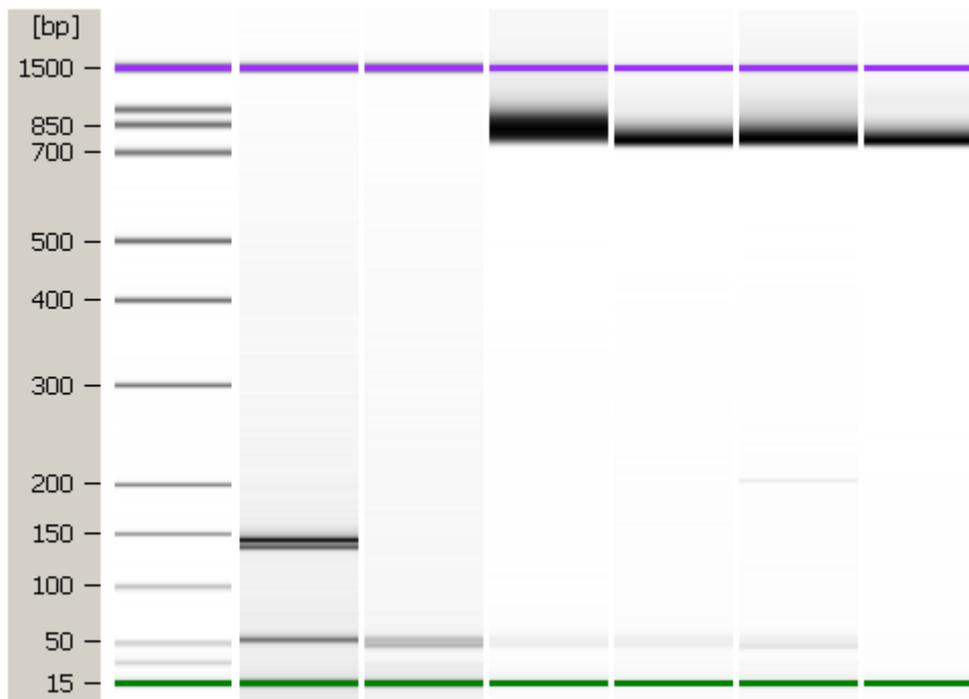


Abbildung 13: gel-like picture von PCR-Produkten aus der *ospA* semi-nested PCR. Links ist der mitlaufende Größenstandard zu sehen. Die Produktgröße und die Konzentration der starken Banden rechts konnte mit der Software ausgerechnet werden. Sie waren jeweils hoch genug für eine Sequenzierung. Die ersten zwei Banden links unten wiesen eine zu niedrige Konzentration auf.

3.10.2 RFLP und Sequenzierung

Diese beiden Methoden dienen zur Detektion des PCR-Produktes aus der *ospA* semi-nested PCR. Die RFLP-Analyse wurde hierbei vornehmlich eingesetzt, *B. garinii* von *B. bavariensis* zu unterscheiden. Insgesamt wurde sie in 23 Fällen eingesetzt und lieferte aber nur bei drei Proben Ergebnisse. Zweimal wurde *B. garinii* Serotyp 6 detektiert und einmal *B. garinii*, wobei keine Serotypenbestimmung möglich war. Abb. 14 zeigt ein Gelbild von *B. garinii* Serotyp 6 mit dem charakteristischen Bandenmuster.

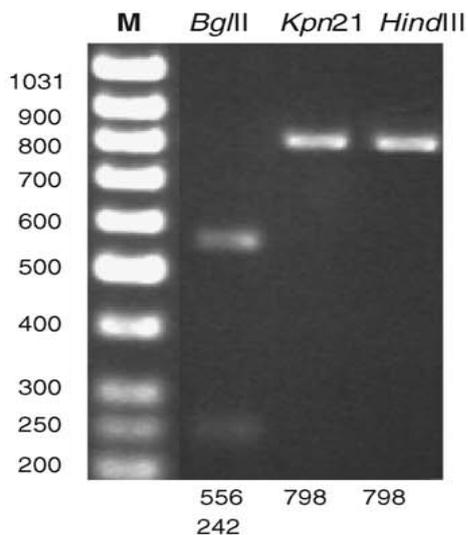


Abbildung 14: Abgebildet ist das Gelbild einer Elektrophorese nach RFLP-Verdau. Links ist der mitlaufende Größenstandard zu sehen.

Eine höhere Ausbeute wurde bei der Sequenzierung erzielt. Einerseits diente sie dazu, Mischinfektionen und nicht sicher identifizierbare Proben – darunter fielen auch *B.garinii/B. bavariensis* und *B. spielmanii/B. valaisiana* – zu bestätigen, andererseits wurde sie eingesetzt, um die Ergebnisse der Prävalenzstudie abzusichern. Hierfür wurden Proben, die in der *hbb* real-time PCR als eine der vier oben genannten Genospezies identifiziert worden war, sequenziert. In Abb. 15 ist ein typisches Ergebnis einer Sequenzieranalyse gezeigt. Die farbigen Peaks entsprechen den einzelnen Nukleotiden der untersuchten Sequenz. Diese wurde dann in die Datenbank von SmartGene geladen und dort nach passenden Sequenzen gesucht.

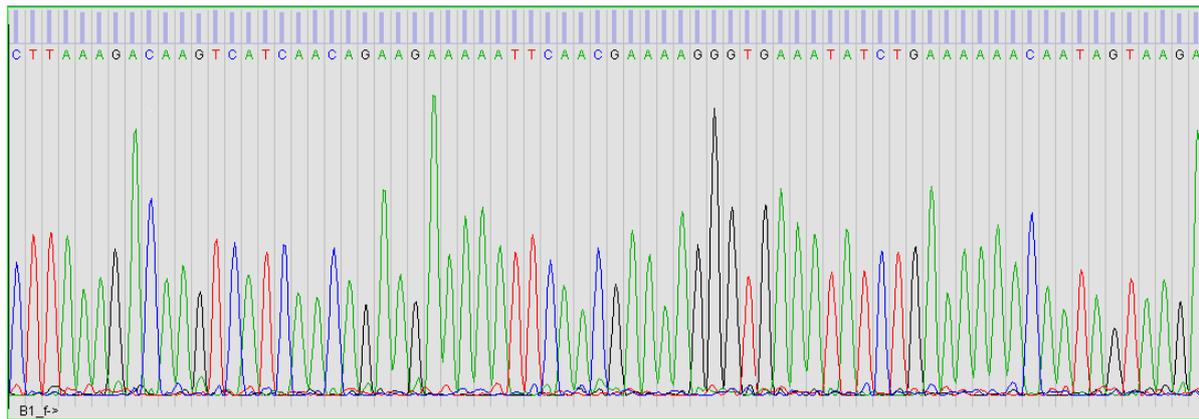


Abbildung 15: In dieser Abbildung sind die Peaks einer Sequenzierung zu sehen. Jeder Peak entspricht einem bestimmten Nukleotid. Grün=Adenosin, schwarz=Guanodin, rot=Thymin, blau=Cytosin.

Insgesamt wurden 18 Proben mit dieser Methode untersucht. Darunter waren vier nicht identifizierbare Proben, drei mögliche Mehrfachinfektionen, die nach der *ospA*-PCR aber nur eine Bande aufwiesen, und zur Absicherung der Prävalenzstudie zwei *B. garinii*, eine *B. bavariensis*, eine *B. spielmanii* und sieben *B. valaisiana*.

Die vier nicht sicher identifizierbaren Proben stellten sich nachträglich als eine *B. burgdorferi* s.s., zwei *B. garinii* und eine *B. spielmanii* dar.

Die möglichen Mehrfachinfektionen waren in der *hbb*-PCR zweimal als Kombination *B. garinii/B. valaisiana* und einmal als *B. burgdorferi* s.s./*B. valaisiana* identifiziert worden. Nach der *ospA*-PCR konnte aber nur eine starke Bande detektiert werden, deren Sequenzanalyse dreimal *B. valaisiana* ergab.

Die zwei *B. garinii*-Proben wurden als ebensolche sequenziert, die eine *B. bavariensis*-Probe wurde als *B. garinii* (97% Übereinstimmung) sequenziert. Bei den sieben *B. valaisiana* ergab die Sequenzierung in sechs Fällen eben diese Genospezies und einmal *B. spielmanii* (98% Übereinstimmung). Die zu untersuchende *B. spielmanii* ergab in der Sequenzierung das gleiche Ergebnis.

3.11 Prävalenzstudie im Rahmen der VICCI-Studie

Mit den Ergebnissen aus den vorausgegangenen Kapiteln konnten Aussagen über die Prävalenz von Borrelien in Zecken bzw. die regionale Verteilung der einzelnen Borrelienspezies getroffen werden. Zudem konnten diese Daten mit den erhobenen Klimadaten kombiniert und ausgewertet werden.

3.11.1 Infektionsraten von *Ixodes ricinus* mit Borrelien

Der Infektionsstatus konnte mit der *p41* real-time PCR bestimmt werden. Die Infektionen wurden nach Entwicklungsstadium bzw. die infizierten Adulten nochmals nach Geschlecht aufgeteilt. Von den insgesamt 4508 Zecken waren 597 mit Borrelien infiziert, was einer Infektionsrate von 13,2% entsprach.

Aufgeteilt nach Stadien zeigte sich, dass deutlich mehr adulte Zecken als Nymphen infiziert waren. Insgesamt 348 Imagines gegenüber 249 Nymphen (18,6% bzw. 9,4%) waren positiv. Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$). Deutlich mehr Weibchen ($n=238$ bzw. 27,7%) als Männchen ($n=110$ bzw. 11,0%) waren infiziert. Auch dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$). Die einzige gefangene Larve war negativ für Borrelien-DNA.

Aufgeschlüsselt nach den verschiedenen Standorten ließen sich große Unterschiede in den Infektionsraten sowohl für Nymphen als auch Adulte finden. Insgesamt waren sie in Lindau mit 28,2% am größten, gefolgt vom Englischen Garten mit 19,5%, Oberschleißheim mit 1,8% und dem Bayerischen Wald mit 9,7%. Diese Verteilung ist signifikant ($p < 0,001$) unterschiedlich. Die Prävalenzen von Infektionen adulter Zecken an den unterschiedlichen Probenorten lagen zwischen 16,8% (Oberschleißheim) und 50,0% (Lindau), die der Nymphen zwischen 8,1% (Bayerischer Wald) und 19,3% (Lindau). Die Infektionsrate für Imagines war an allen Standorten höher als die der Nymphen. Keine der zwölf gefangenen *Ixodes ricinus* (acht Nymphen und vier Adulte) aus dem Nationalpark Bayerischer Wald war positiv für Borrelien. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 verdeutlicht.

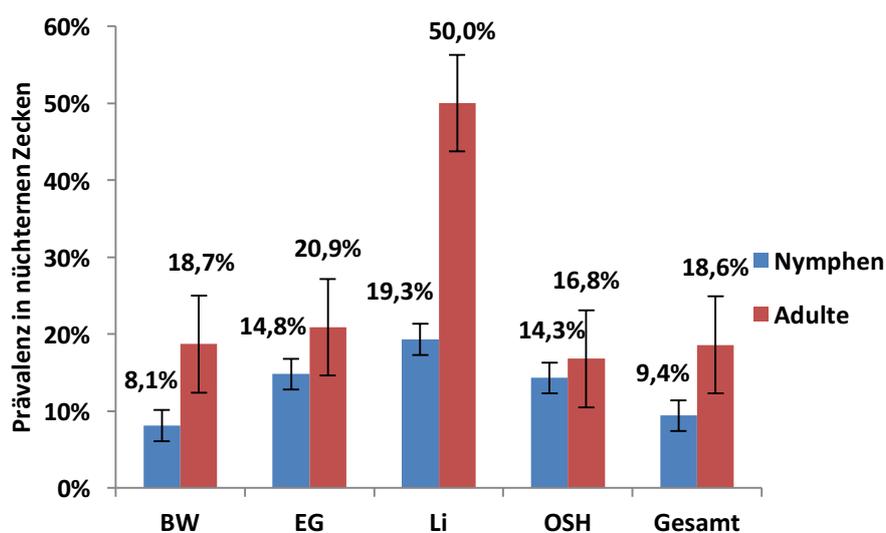


Abbildung 16: Abgebildet sind die Infektionsraten der Zecken – aufgeschlüsselt nach Nymphen und Adulten – mit Borrelien an den verschiedenen Sammelorten. Auf der y-Achse ist die Infektionsrate in Prozent angegeben, auf der x-Achse die einzelnen Probenorte. Für jeden Balken wurden zudem ein 95%-Konfidenzintervall berechnet.

Die Infektionsraten an den einzelnen Probenorten im Bayerischen Wald schwankten zwischen 3,5% und 33,3% für Nymphen und 0,0% (an dieser Sammelstelle wurde allerdings nur eine gesammelt) bis 31,3% für Adulte (Abb. 17). Sie waren damit ähnlich heterogen verteilt wie an anderen Orten in Bayern. Insgesamt waren mehr Adulte (18,7%) als Nymphen (8,1%) infiziert. Diese Verteilung ist signifikant unterschiedlich ($p < 0,001$).

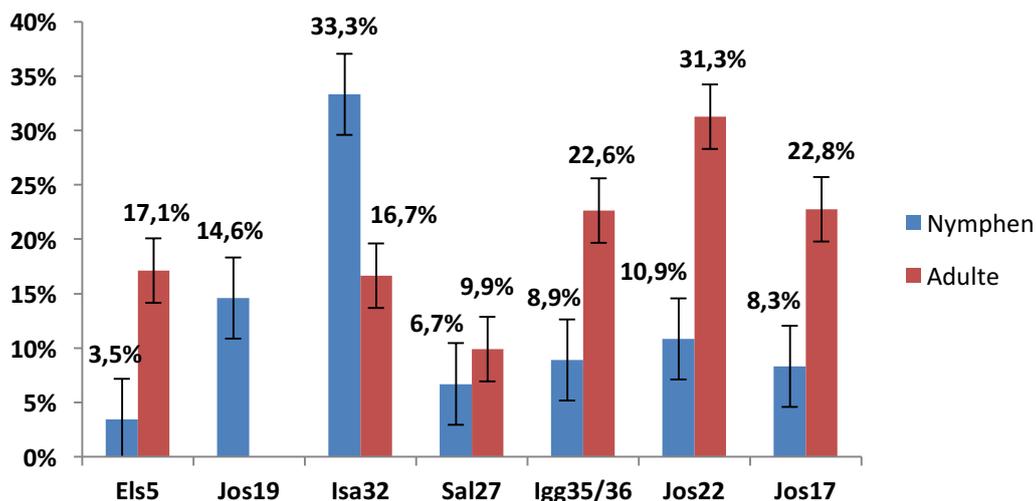


Abbildung 17: Abgebildet sind die Infektionsraten der Zecken – aufgeschlüsselt nach Nymphen und Adulten – mit Borrelien an den einzelnen Probenorten im Bayerischen Wald. Auf der y-Achse ist die Infektionsrate in Prozent angegeben, auf der x-Achse die einzelnen Probenorte. Für jeden Balken wurden zudem ein 95%-Konfidenzintervall berechnet. Für die Abkürzungen s. Anhang 1.

3.11.2 Verteilungsmuster von *Borrelia* spp. in Bayern

Mit Hilfe der *hbb* real-time PCR konnten die positiven Proben differenziert und somit Verteilungsmuster der unterschiedlichen Genospezies an den unterschiedlichen Sammelorten erstellt werden. Hierbei zeigten sich deutliche regionale Unterschiede, wahrscheinlich beeinflusst durch Vegetation und Wildtiervorkommen. *B. afzelii* wurde als dominierende Spezies an allen Sammelorten nachgewiesen und war somit die häufigste in ganz Bayern ($n=193$ bzw. 31,0%). Diese Verteilung ist nicht signifikant ($p=0,072$).

Als zweithäufigste Spezies an allen Standorten und damit in ganz Bayern konnte *B. burgdorferi* s.s. ($n=148$ bzw. 23,8%) dokumentiert werden. Die Anzahl der übrigen Genospezies war vergleichsweise geringer und schwankte sehr stark zwischen einzelnen Sammelpunkten. So wurde *B. garinii* als dritthäufigste Spezies in Oberschleißheim und im Bayerischen Wald identifiziert, an den anderen beiden Orten war die Prävalenz verschwindend gering. *B. bavariensis* wurde kein einziges Mal im Englischen Garten gefunden, in Lindau hingegen mehrfach. *B. spielmanii* wurde nur einmal im Bayerischen

Wald gefunden, während es im Englischen Garten die dritthäufigste Spezies darstellte; und für *B. valaisiana* wurde eine fokale Prävalenz in Oberschleißheim festgestellt. Bei 149 positiven Proben (23,9%) war keine Speziesdifferenzierung möglich. Die Verteilung der Borrelien (auch an den einzelnen Standorten im Bayerischen Wald) ist Abb. 18 und Abb. 19 zu entnehmen.

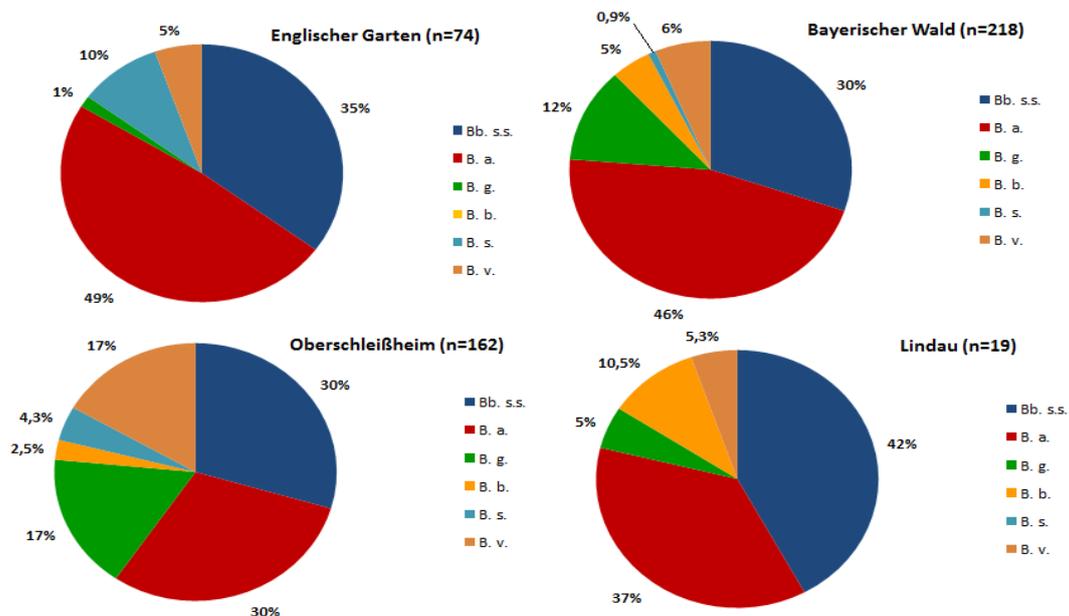


Abbildung 18: Die Kreisdiagramme stellen die Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies an den vier Sammelorten dar. B.a.=*B. afzelii*, Bb. s.s.=*B. burgdorferi* s.s., B.g.=*B. garinii*, B.b.=*B. bavariensis*, B.v.=*B. valaisiana*, B.s.=*B. spielmanii*.

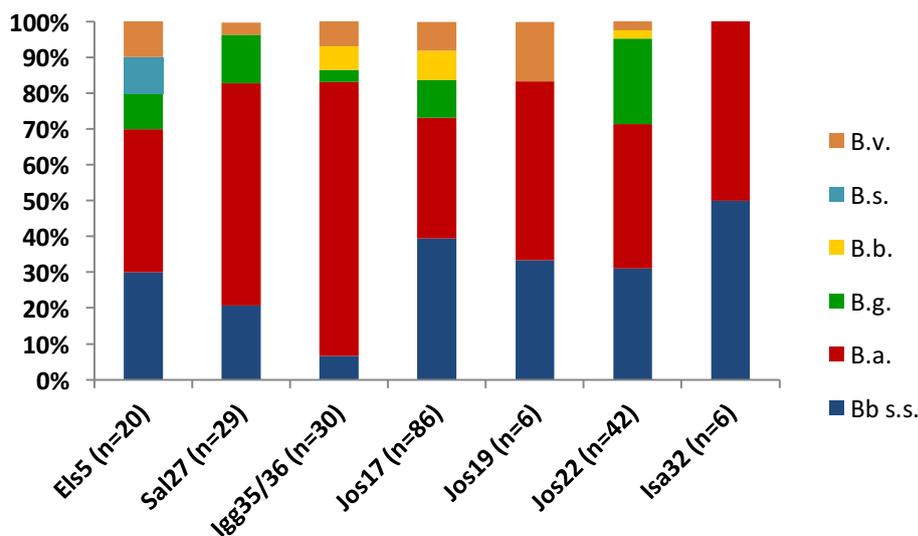


Abbildung 19: Die Balkendiagramme stellen die Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies an den Sammelorten im Bayerischen Wald dar. Die Abkürzungen entsprechen Abb. 17.

Die Verteilung des Borrelienspezies auf Nymphen und Adulte bestätigte den allgemeinen Trend: auch hier war *B. afzelii* führend bei allen Standorten für die Imagines. Für die Nymphen zeigte sich ein ähnliches Bild; nur in Lindau war *B. burgdorferi* s.s. häufiger. *B. garinii* war häufiger in adulten Zecken zu finden, im Englischen Garten und in Oberschleißheim war sie nur in diesem Stadium zu finden. *B. spielmanii* war ebenfalls fast nur bei adulten Zecken zu finden und auch dort nicht häufig, am ehesten noch im Englischen Garten (10%). *B. valaisiana* tauchte bemerkenswerterweise in Lindau nur in Nymphen auf, im Englischen Garten dagegen nur in Imagines und dann nur in Mischinfektionen. Für *B. bavariensis* gab es über alle Standorte mit der Ausnahme Englischer Garten (hier sind keine *B. bavariensis* zu finden) gesehen niedrige Fallzahlen, sowohl für Adulte als auch Nymphen. Die genauen Zahlen sind dem Anhang 5 und Abb. 20 zu entnehmen.

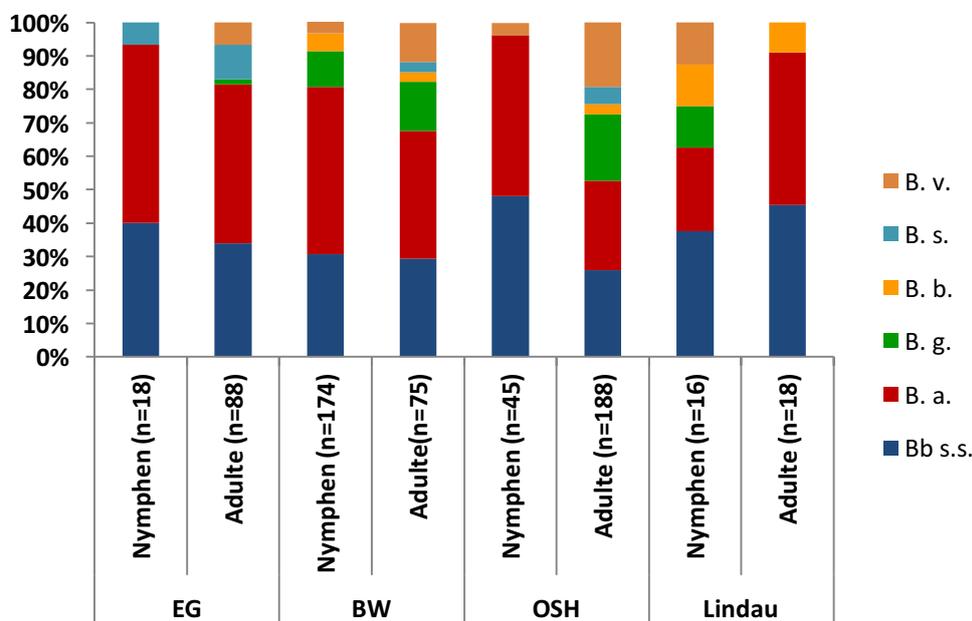


Abbildung 20: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies auf Nymphen und Adulte. Die Abkürzungen entsprechen Abb. 17.

Auch für die einzelnen Beprobungspunkte im Bayerischen Wald wurde die Speziesverteilung auf Nymphen und Adulte ermittelt. Neben der allgemeinen Dominanz von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s., fiel auf, dass *B. spielmanii* nur bei Adulten zu finden war. Alle anderen Genospezies verteilten sich gleichmäßig auf die beiden Entwicklungsstufen. Zur Verdeutlichung s. Anhang 6 und Abb. 21.

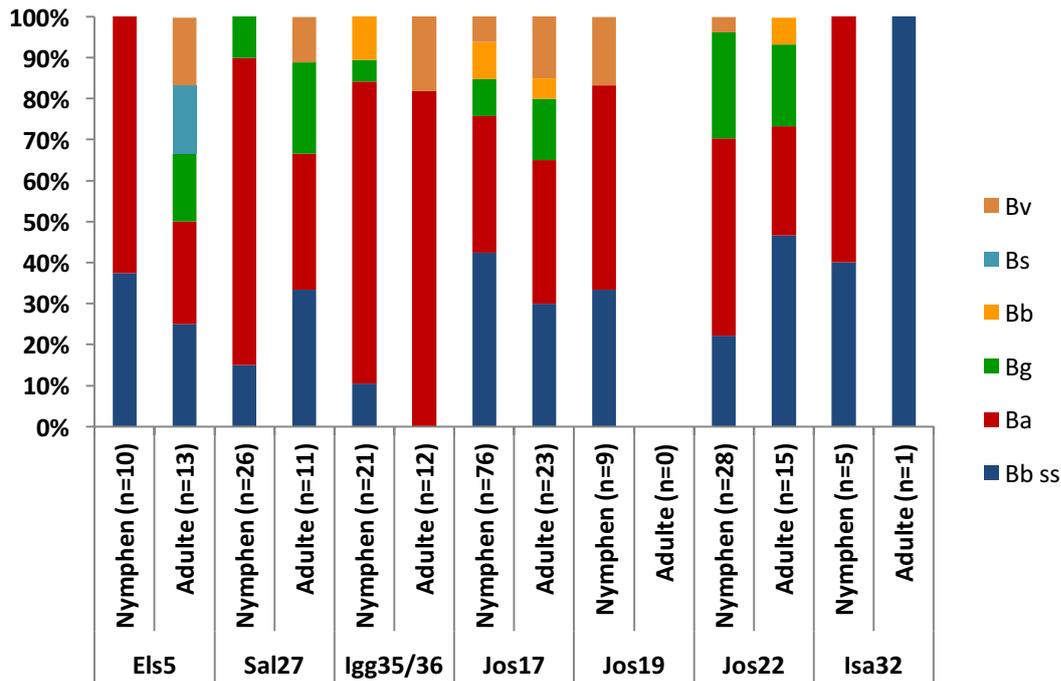


Abbildung 21: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies auf Nymphen und Adulte im Bayerischen Wald. Die Abkürzungen entsprechen Abb. 17.

Die in Deutschland seltene Genospezies *B. lusitaniae* konnte dagegen nicht dokumentiert werden, möglicherweise da sie von der *p41* real-time PCR nicht erfasst wird.

3.11.3 Mehrfachinfektionen

Von allen untersuchten Zecken waren 20 nach den Ergebnissen der *hbb* real-time PCR mehrfach infiziert. Vornehmlich waren es adulte Zecken (80%). Diese Verteilung ist signifikant ($p=0,019$). Am häufigsten wurden Mehrfachinfektionen in Proben aus dem Englischen Garten nachgewiesen (60%), gefolgt von Proben aus Oberschleißheim und dem Sulzsteg im Bayerischen Wald (jeweils 15%). Es wurden acht unterschiedliche Kombinationen von Borrelien gefunden, wobei die Kombination aus *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s am häufigsten war (35%). Ebenfalls häufig war die Mehrfachinfektion *B. afzelii*/*B. garinii*/*B. valaisiana* (15%). Fünf Proben (alle aus dem Englischen Garten) wurden als Dreifachinfektion identifiziert. In Tab. 24 sind diese Ergebnisse detailliert aufgeführt.

Tabelle 24: Häufigkeit, Kombinationen und Verteilung der Mehrfachinfektionen

Status	Anzahl	Ort	Anzahl	Kombination	Anzahl
Nymphen	4 (20%)	EG	12 (60%)	Bb s.s./B.a.	7 (35%)
Adulte	16 (80%)	OSH	3 (15%)	Bb. s.s./B.v.	1 (5%)
weiblich	10 (50%)	Li	1 (5%)	B.a./B.v.	2 (10%)
männlich	6 (30%)	Els5	1 (5%)	B.a./B.s.	2 (10%)
		Jos17	3 (15%)	B.g./B.v.	2 (10%)
				B.g./B.b.	1 (5%)
				Bb.s.s./B.a./B.v.	2 (10%)
				B.a./B.g./B.v.	3 (15%)

In der *ospA*-PCR mit anschließender Sequenzierung konnte keine der 20 Proben bestätigt werden, da nur drei Proben eine Bande nach der konventionellen Amplifizierung aufwiesen (s. Kap. 3.10).

3.12 Optimierung der Borrelien-Diagnostik

3.12.1 Ergebnisse der Pico-Green Messungen

Zur Herstellung der fehlenden Verdünnungsreihen von PotiB2, PRef, PGau, PBr, PSig2 und Pka2 wurde die DNA-Konzentration der isolierten Stocklösungen mittels Pico-Green (s. Kap. 2.5.1.1.1) gemessen, um mit Hilfe des Ergebnisses Verdünnungsreihen herzustellen. Von allen anderen Stämmen lagen diese bereits vor.

Für PotiB2 ergab sich eine Konzentration von 0,87 ng/μl, für PRef von 0,80 ng/μl, für PGau von 0,71 ng/μl, für PBr von 0,49 ng/μl, für PSig2 von 0,78 ng/μl und für Pka2 von 0,44 ng/μl. Mit diesen Ergebnissen konnten anhand einer Formel (s. Kap. 2.5.1.1.2) Verdünnungsreihen von 100.000 Kopien bis 0,1 Kopien pro PCR-Ansatz, also in 5 μl, hergestellt werden.

3.12.2 Validierung des Attomol-Kits

Zur Verbesserung der Diagnostik der Lyme-Borreliose wurde das Kit „B. burgdorferi real-time“ der Firma Attomol validiert.

Hierzu wurden die standardisierten Verdünnungsreihen hinsichtlich ihres LOD überprüft. Dazu wurde der Ct von 100.000 Kopien bis 1 Kopie dreifach bestimmt und für 0,1 Kopien sechsfach. Als erstes Ergebnis lässt sich festhalten, dass jede der getesteten Spezies (s. Tab.

17) detektiert werden konnte. Abb. 22 zeigt hierzu als Beispiel die Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe, in diesem Fall von PHei.

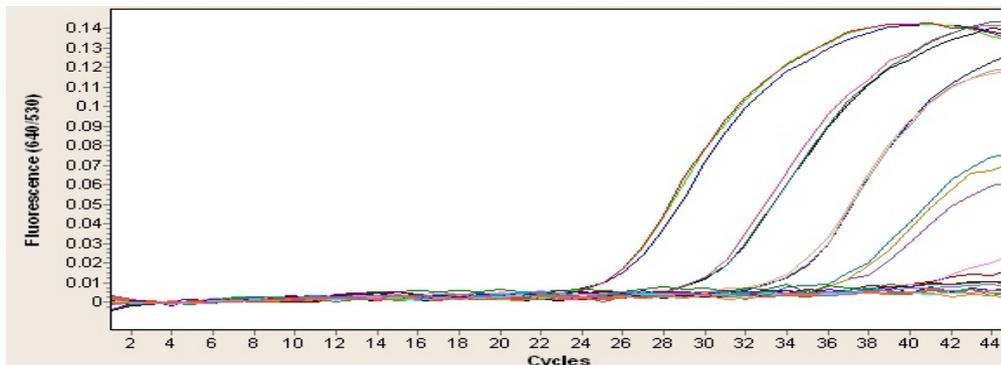


Abbildung 22: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe zur Austestung des Kit „B. burgdorferi real-time“ (Attomol). Die Fluoreszenzintensität ist gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Von links nach rechts zeigen die Kurven 100.000, 10000, 1000, 100 und 10 Kopien.

Um eine Inhibition der PCR auszuschließen, wurde die Amplifikation des internen Standards beurteilt (s. Abb. 23). Wurde er regelgerecht vervielfältigt, konnte das Ergebnis der LOD-Bestimmung verwertet werden.

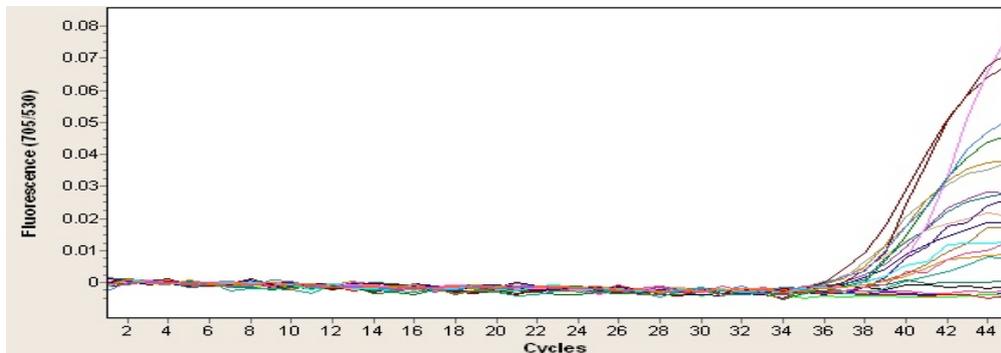


Abbildung 23: Amplifikationskurven des internen Standards des Kit „B. burgdorferi real-time“ (Attomol). Die Fluoreszenzintensität ist gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Der interne Standard wird regelgerecht amplifiziert. Sollte dies nicht der Fall sein, spricht dies für eine Inhibition der PCR.

Die Ermittlung des LOD mit den standardisierten Verdünnungsreihen zeigte folgende Ergebnisse (s. a. Anhang 7). In der Tabelle sind die getesteten Stämme und ihr ermitteltes LOD aufgetragen, definiert als letzte Cp-Stufe, bei der noch drei Amplifikationen registriert werden konnten. Das LOD für die allermeisten Stämme lag bei 10 Kopien. Nur der Stamm TN (*B. garinii* Serotyp 6) und der Stamm Bjap (*B. japonica*) wiesen eine schlechtere Nachweisgrenze mit 100 bzw. 100.000 Kopien auf.

Da in der PCR-Diagnostik – unabhängig von der Fragestellung – das LOD von entscheidender Bedeutung ist, sind in Tab. 25 noch einmal kurz gefasst die Nachweisgrenzen aller Stämme aufgelistet.

Tabelle 25: Das LOD der einzelnen Borrelienstämme. K=Kopien

Stamm	Pka2	PGau	PBr	PBi	PHei	TN	PRef
LOD	10 K	10 K	10 K	10K	10 K	100 K	10 K

Stamm	Pla	20047	IP90	PSig2	VS116	PotiB2	Bjap
LOD	10 K	10 K	10 K	10 K	10 K	10 K	100000 K

Um das Attomol-Kit mit anderen Kits und dem neuem Duplex- bzw. Triplex-Ansatz vergleichen zu können, wurde zudem für jeden Stamm die Effizienz der PCR, d.h. wie gut das System performt, die Steigung der Standardgeraden (slope) sowie R^2 , das Bestimmtheitsmaß, berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 26 gezeigt. Für *B. japonica* konnten die drei Variablen nicht berechnet werden, da nur eine Verdünnungsstufe detektiert werden konnte und daraus keine Standardgerade generiert werden konnte.

Tabelle 26: Ergebnisse der Effizienz-Berechnung für das Attomol-Kit

Stamm	Effizienz	slope	R^2
Pka2	104,9%	-3,109	0,971
PGau	107,1%	-3,024	0,965
PBr	90,0%	-3,997	0,963
PBi	91,3%	-3,828	0,971
PHei	95,0%	-3,590	0,994
TN	90,0%	-3,874	0,947
PRef	91,2%	-3,831	0,953
Pla	100,5%	-3,298	0,996
20047	92,3%	-3,726	0,986
IP90	89,9%	-3,925	0,979
PSig2	106,5%	-3,043	0,963
VS116	125,0%	-2,418	0,902
PotiB2	94,5%	-3,617	0,963
Bjap	nicht berechenbar	nicht berechenbar	nicht berechenbar

Alle Effizienzen lagen in einem Bereich von 90-110%. Somit kann davon ausgegangen werden, dass pro Zyklus ein DNA-Fragment verdoppelt wird. Das Bestimmtheitsmaß zeigt für die getesteten Stämme Werte von 0,902-0,994, also nahe 1. Das bedeutet, dass die

Effizienzwerte kaum um die Standardgerade streuen und somit die Cp-Werte durch die PCR zustande gekommen sind und nicht durch Zufall.

3.12.3 Spezifitätstestung für das Attomol-Kit

Zusätzlich zur Sensitivitätsbestimmung mit Borrelien wurde die Spezifität des Attomol-Kits mit verwandten Spirochäten (s. Tab. 20) ausgetestet. Die Ergebnisse der Austestung sind in Tab. 27 aufgeführt.

Tabelle 27: Ergebnisse der Spezifitätstestung für das Attomol-Kit

Stamm	Crossing point (Mittelwert aus n=3) bei 10000 Kopien
L1	No Ct (3/3)
L2	No Ct (3/3)
L3	No Ct (3/3)
L4	No Ct (3/3)
L5	No Ct (3/3)
L6	No Ct (3/3)
L7	No Ct (3/3)
L8	No Ct (3/3)
L9	No Ct (3/3)
L10	No Ct (3/3)
L11	No Ct (3/3)
L12	No Ct (3/3)
L13	No Ct (3/3)
L14	No Ct (3/3)
L15	No Ct (3/3)
L16	No Ct (3/3)
L17	No Ct (3/3)
L18	No Ct (3/3)
<i>B. recurrentis</i>	No Ct (3/3)
<i>B. hermsii</i>	36,16 (3/3)
<i>B. miyamoto</i>	No Ct (3/3)
<i>B. duttoni</i>	No Ct (3/3)
<i>Treponema phagedenis</i>	No Ct (3/3)

Bei allen Proben außer *B. hermsii* konnte bei 10000 Kopien kein Cp ermittelt werden, so dass diese Proben nicht weiter untersucht wurden. Von *B. hermsii* hingegen wurde eine komplette Verdünnungsreihe angelegt und untersucht. Zeigte sich der Cp von 10000 Kopien wiederum im selben Bereich, konnte bei 1000 Kopien in Dreifachbestimmung kein Cp ermittelt werden.

Somit ergab sich für die Spezifität des Attomol-Kits ein nahezu homogenes Bild, d.h. dass die diagnostischen Ergebnisse der Attomol-Kits sehr selten falsch-positive Befunde sind.

3.13 Validierung der neudesignten real-time PCR-Ansätze

3.13.1 Duplex real-time PCR-Ansatz

Der Entwurf und die Validierung dieses neuen Ansatzes dienten ebenfalls zur Verbesserung der Diagnostik bzw. des Screenings von Zeckenisolaten. Ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Kits (*p41* real-time, *hbb* real-time, *ospA* real-time, Microgene, *ospA* konventionell) wurde deshalb vorgenommen.

Im ersten Schritt wurde in Kooperation mit der Forschungs- und Entwicklungsabteilung des LGL Bayern ein *ospA*-Singleplex-Ansatz mit dazu gehörigem PCR-Temperaturprofil aufgestellt. Die genauen Angaben sind Tab. 28 und Tab. 29 zu entnehmen.

Tabelle 28: Mastermixzusammensetzung der *ospA* Singleplex-PCR

Komponenten	Konzentration [μM]	Konzentration PCR-Ansatz [μM]	Volumen [μl]
TaqMan Master (Roche, Mannheim, Deutschland)	2x	1x	12,5
Ospa_for2, Vorwärtsprimer	10		1
Ospa_rev2, Rückwärtsprimer	10		1
OspA_TM_Cy5, Sonde	10		0,25
nukleasefreies Wasser			5,25
Template oder Wasser für NTC			5
Gesamtvolumen			20

Tabelle 29: Temperaturprofil der *ospA* Singleplex PCR

Temperaturprofil	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Aktivierung	95	900	1x
Amplifikation	95	15	45x
	60	60	
	72	30	

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse des Primerdesigns ausgewertet. Die beiden Stämme PotiB2 und PotiB3 wurden regelgerecht amplifiziert, was einer inklusiven Spezifität von 100% entsprach. Alle anderen Borrelienstämme (s. Tab. 17) wurden dagegen von den designten Oligonukleotiden nicht erfasst. Dies bedeutete eine exklusive Spezifität von ebenfalls 100%.

Diese Ergebnisse wurden nochmals bestätigt, indem die PCR-Produkte von PotiB2 und IP90 aus einem *ospA*-Singleplex-Ansatz am Bionalyzer (s. Kap 2.4.4.1) detektiert wurden.

In Abb. 24 ist deutlich die starke Bande mit einer spezifischen Produktgröße von ca. 116 Bp für PotiB2 zu sehen, während IP90 mit dem *ospA*-Singleplex-Ansatz nicht amplifiziert wurde.

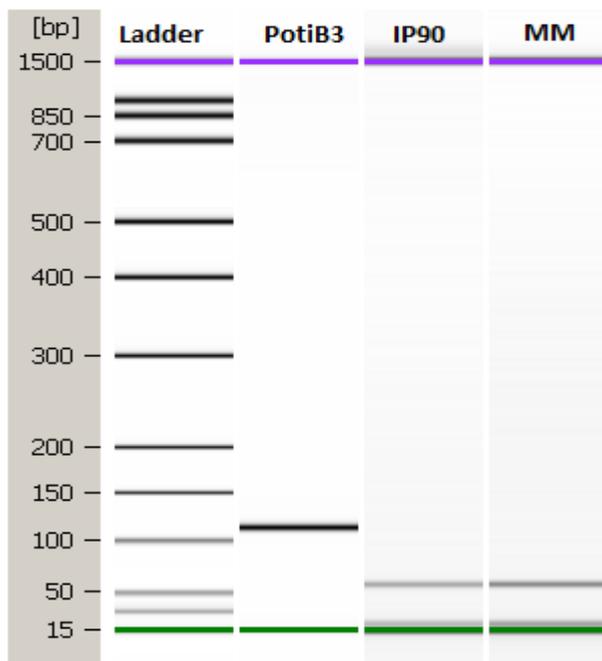


Abbildung 24: Die Abbildung zeigt ein gel-like picture für die Detektion des PCR-Produkts aus einem *ospA*-Singleplex-Ansatz. Auf der linken Seite ist der Größenstandard (ladder) zu sehen. PotiB2 (*B. lusitaniae*) weist hierbei eine starke Bande mit einer Größe von ca. 116 Bp auf, während IP90 (*B. garinii*) und die Mastermixkontrolle überhaupt keine Bande zeigen. MM=Mastermix

Im nächsten Schritt wurde die optimale Annealing-Temperatur für die *ospA*-Primer mittels einer Gradienten-PCR ermittelt. Die getesteten Temperaturen waren 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C und 60 °C. Für 54 °C zeigte sich in der anschließenden Auswertung mittels Bioanalyser die stärkste Bande (s. Abb. 25). Auch das *p41*-System lieferte bei dieser Temperatur immer noch sehr gute Ergebnisse (s. Abb. 25).

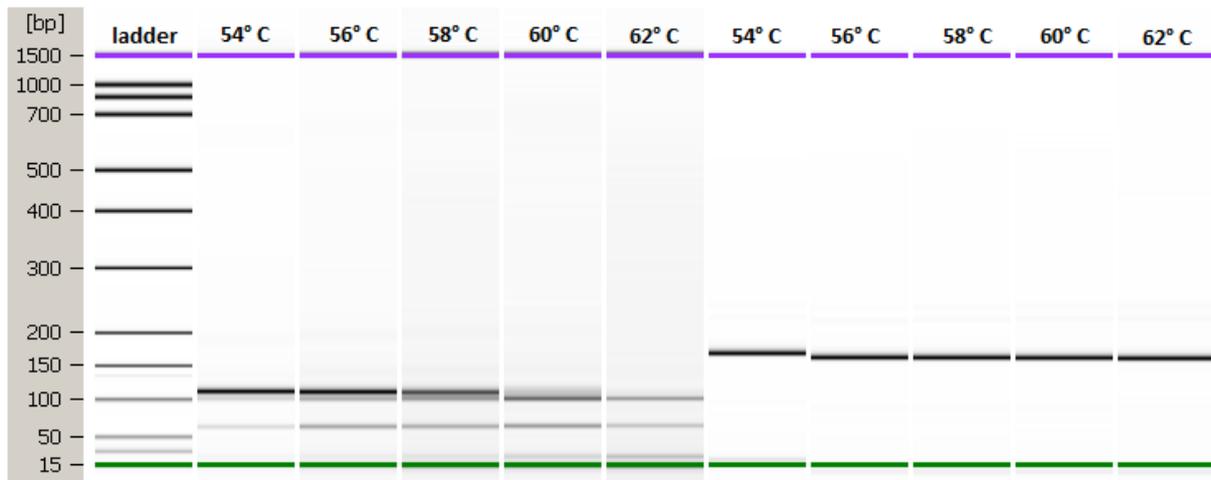


Abbildung 25: Ergebnisse der Robustheitstestung für die *ospA*- und *p41*-Primer. Oben sind die einzelnen Temperaturen des Temperaturgradienten eingezeichnet, links der Größenstandard. Während das *p41*-System (rechts) konstant ausreichend große Banden aufweist, ist für *ospA* (links) nur bei 54 °C eine starke Bande zu sehen.

Nachdem damit die optimale Annealing-Temperatur bestimmt worden war, schloss sich eine Titrierung von Primern und Sonde jeweils in fünf Stufen an: für die Primer 300 μM , 400 μM , 500 μM , 600 μM und 700 μM und für die Sonde 150 μM , 200 μM , 300 μM , 400 μM und 450 μM . Dabei ergab sich, dass die optimale Konzentration im Singleplex-Ansatz für die Primer *OspA_for2* und *OspA_rev2* bei 600 μM lag und die optimale Konzentration für die Sonde *OspA_TM_Cy5* bei 150 μM .

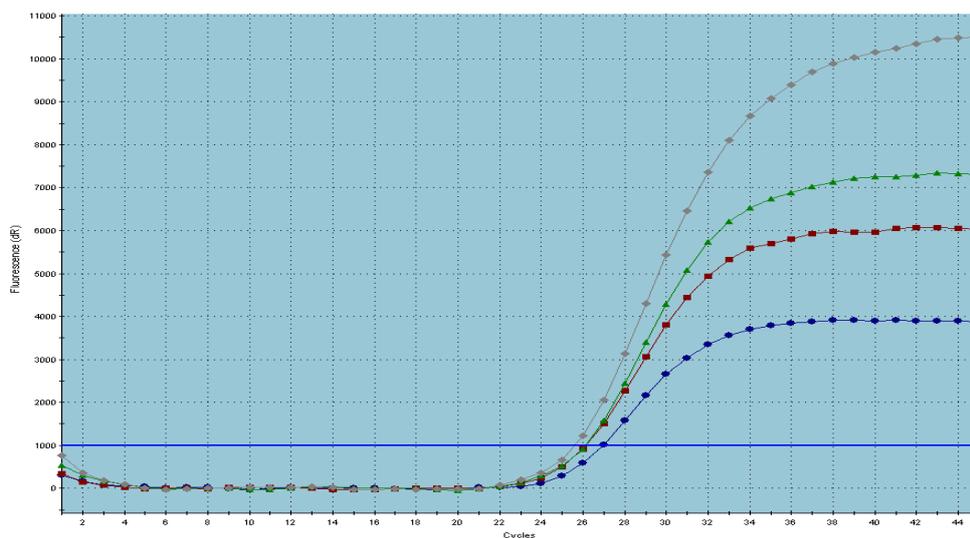


Abbildung 26: Beispielhaft ist hier das Ergebnis einer Sondentitrierung abgebildet. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Die oberste Kurve entspricht einer Konzentration von 400 μM , dann absteigend 300 μM , 200 μM und 150 μM .

Mit diesen Angaben konnte nun ein Protokoll für einen 25 μ l- PCR-Ansatz aufgestellt werden, da die *p41*-Komponenten auf der gleichen Konzentration eingestellt blieben. In diesem Ansatz wurde ein multiplextauglicher Ready-to-use Mastermix (Quantitect NoRox Mastermix, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, da der ursprüngliche Roche-Mastermix nur für Singleplex-Ansätze geeignet ist. Die genaue Zusammensetzung ist Tab. 30 zu entnehmen.

Tabelle 30: Mastermixzusammensetzung der Duplex real-time PCR

Komponenten	Konzentration [μ M]	Konzentration PCR-Ansatz [μ M]	Volumen [μ l]
Quantitect NoRox Multiplex Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	2x	1x	12,5
FlaF1, Vorwärtsprimer	10	0,3	0,75
FlaR1, Rückwärtsprimer	10	0,9	2,25
FlaProbe1, Sonde	10	0,2	0,5
Ospa_for2, Vorwärtsprimer	20	0,6	0,75
Ospa_rev2, Rückwärtsprimer	20	0,6	0,75
OspA_TM_Cy5, Sonde	10	0,15	0,375
nukleasefreies Wasser			2,125
Template oder Wasser für NTC			5
Gesamtvolumen			25

Nach Aufstellung des Protokolls mit den oben genannten Konzentrationen wurde im neuen Ansatz ebenfalls noch einmal die *ospA*-Primer und -sonde in den bekannten Stufen titriert. Auch hier zeigte sich, dass 600 μ M für die Primer und 150 μ M für die Sonde die optimale Konzentration darstellte.

Des Weiteren wurde das Thermoprofil um einen 72 $^{\circ}$ C-Schritt zu einem three-step Protokoll (s. Tab. 31) erweitert, um der Polymerase mehr Zeit zu geben, in beiden Systemen neue DNA-Stränge zu synthetisieren und damit die Sensitivität zu erhöhen.

Tabelle 31: Temperaturprofil der Duplex real-time PCR

Temperaturprofil	Temperatur [°C]	Reaktionsdauer [Sek]	Zyklen
Aktivierung	95	900	1x
Amplifikation	95	15	45x
	54	60	
	72	30	

Alle Versuche wurden mit standardisierten Verdünnungsreihen der Stämme IP90 und PotiB2 durchgeführt, wobei immer ein Singleplex-Ansatz als Vergleich mitlief.

3.13.2 Triplex real-time PCR-Ansatz

Da es in der Diagnostik wünschenswert ist, überprüfen zu können, ob Inhibitoren in der zu untersuchenden Matrix das Ergebnis beeinflussen und damit verfälschen, wurde versucht in den Duplex-Ansatz eine Inhibitionskontrolle einzubauen. Die Wahl fiel dabei auf ntb2, ein Plasmid des Tabakmosaikvirus (*Nicotiana tabacum*).

Die Konzentrationen von Primern und Sonde für das Kontrollsystem wurden aus der Publikation von (Anderson et al. 2010) übernommen. Mit diesen Angaben wurde ein neues Protokoll für einen Triplex-Ansatz aufgestellt. Die *p41*- bzw. *ospA*-Primer und -sonden wurden in ihren Konzentrationen belassen, ebenso wie das Temperaturprofil. Die genaue Zusammensetzung ist Tab. 32 zu entnehmen.

Tabelle 32: Mastermixzusammensetzung der Triplex real-time PCR

Substanz	Konzentration (μM)	Konzentration PCR-Ansatz (μM)	Volumen (μl)
Quantitect NoRox Multiplex Mastermix (Qiagen, Hilden, Deutschland)	2	1	12,5
FlaF1, Vorwärtsprimer	10	0,3	0,75
FlaR1, Rückwärtsprimer	10	0,9	2,25
FlaProbe1, Sonde	10	0,2	0,5
Ospa_for2, Vorwärtsprimer	20	0,6	0,75
Ospa_rev2, Rückwärtsprimer	20	0,6	0,75
OspA_TM_Cy5, Sonde	10	0,15	0,375
ntb2-fw2, Vorwärtsprimer	20	0,4	0,5
ntb2-re2, Rückwärtsprimer	20	0,4	0,5
ntb2-Sonde	20	0,1	0,125
Plasmid (25 Kopien)			1
Template oder Wasser für NTC			5
Gesamtvolumen			25

Auch die folgenden Versuche wurden wieder mit standardisierten Verdünnungsreihen von IP90 und PotiB2 durchgeführt, wobei Singleplex-Ansätze zum Vergleich mitliefen.

3.13.3 Auswertung und LOD-Bestimmung

Die Auswertung der Duplex-PCR stellte sich folgendermaßen dar: Im FAM-Kanal gelang eindeutig die Beurteilung von allen Borrelien außer *B. lusitaniae*, wohingegen im Cy5-Kanal eine regelgerechte Amplifizierung dieser Genospezies nachgewiesen werden konnte. Das LOD lag im Duplex-Ansatz für IP90 bei 10 Kopien und für PotiB2 bei 1 Kopie. Der mitlaufende Singleplex-Ansatz wies die gleiche Sensitivität auf. Abb. 27 verdeutlicht dies.

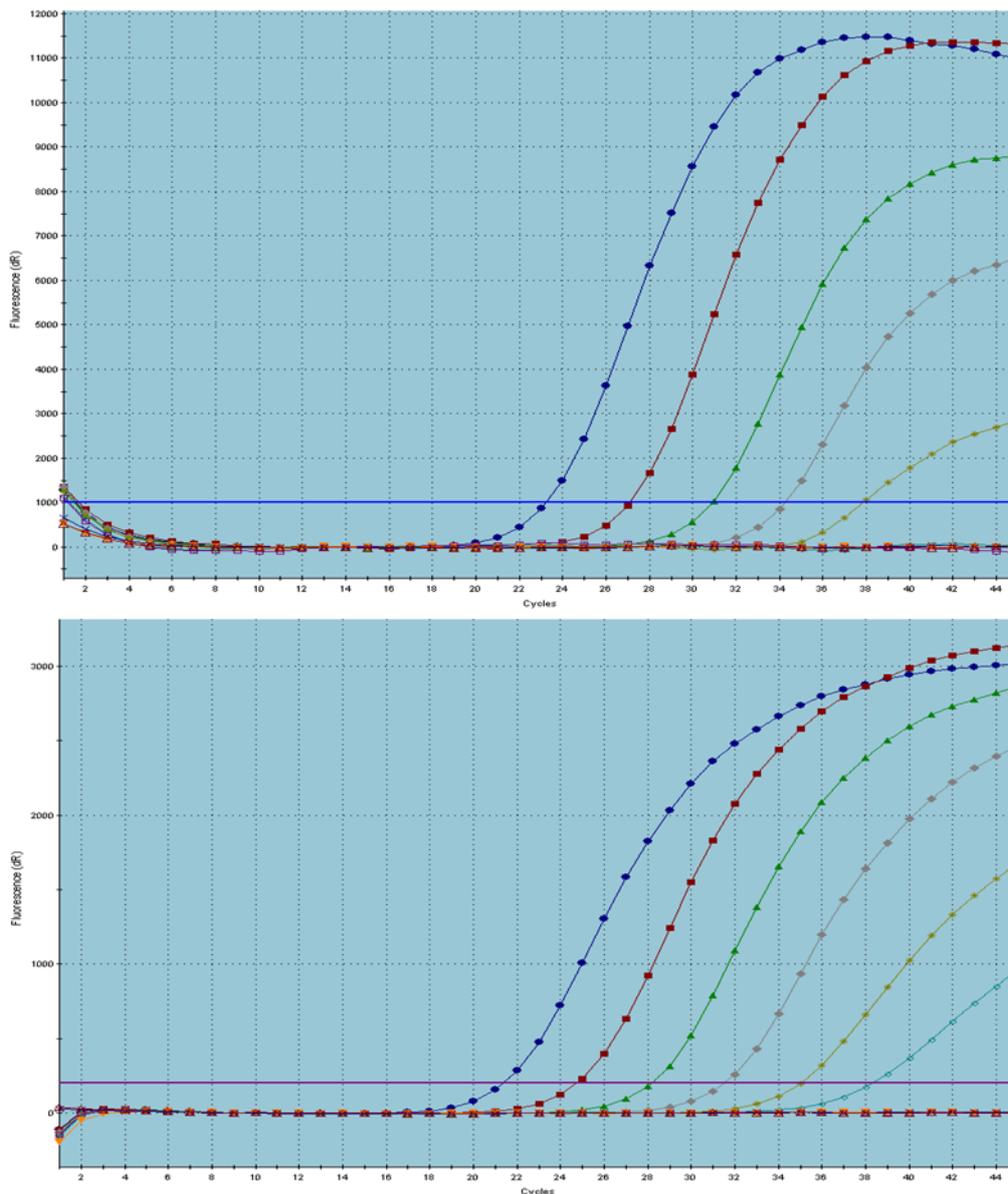


Abbildung 27: Hier sind die Ergebnisse der Validierung des Duplex-Ansatzes abgebildet. Das erste Bild zeigt die Amplifikationskurven für IP90 im FAM-Kanal. Die letzte Kurve oberhalb des Ct ist für 10 Kopien detektierbar. Das zweite Bild zeigt die Kurven für PotiB2 im Cy5-Kanal.

Bei der Auswertung der Triplex-PCR zeigte sich, dass IP90 im FAM-Kanal und PotiB2 im Cy5-Kanal regelgerecht amplifiziert wurden. Allerdings verschob sich das LOD in beiden Fällen auf 100 Kopien nach oben, was eine Verschlechterung im Gegensatz zum Duplex-Ansatz darstellte. Eine Inhibition lag nicht vor, da das ntb2-Plasmid im HEX-Kanal ohne Einschränkung amplifiziert wurde. Abb. 28 verdeutlicht diese Ergebnisse.

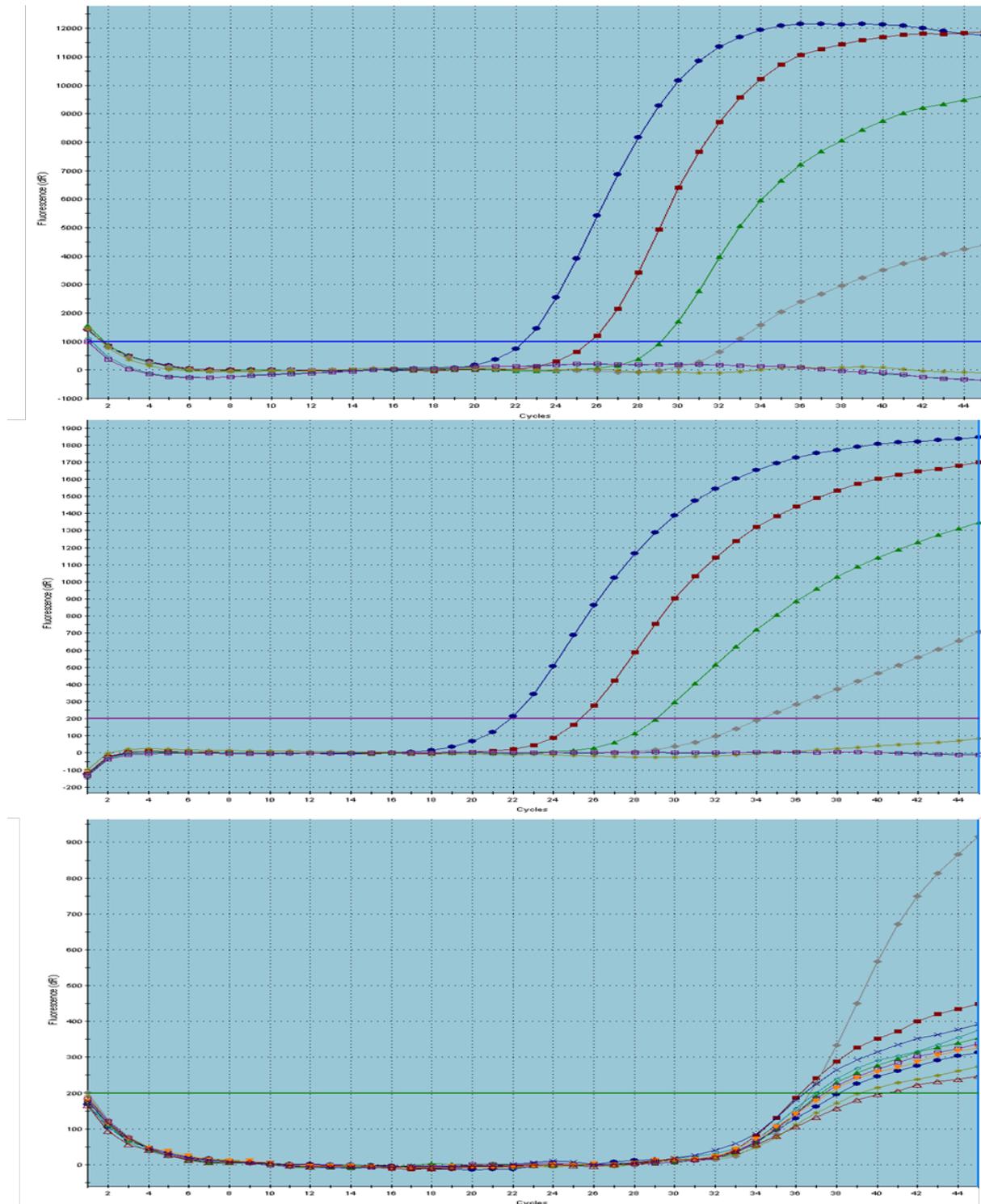


Abbildung 28: Hier sind die Ergebnisse der Validierung des Triplex-Ansatzes abgebildet. Das erste Bild zeigt die Amplifikationskurven von IP90 im FAM-Kanal. Die letzte Kurve oberhalb des Ct ist für 100 Kopien detektierbar. Das zweite Bild zeigt die Kurven für PotiB2 im Cy5-Kanal. Das letzte Bild schließlich zeigt die Amplifikation von ntb2 im HEX-Kanal.

Das LOD wurde als letzte Verdünnungsstufe definiert, an der noch ein Ct festgestellt werden konnte. Zusammenfassend sind in Tab. 33 die Ergebnisse der Validierung der Duplex und Triplex real-time PCR aufgeführt.

Tabelle 33: Ergebnisse der Validierung der Duplex und Triplex real-time PCR-Ansätze (das LOD ist gelb markiert) für PotiB2 (*B. lusitaniae*) und IP 90 (*B. garinii*)

Assay	Zielgen	Crossing threshold (Mittelwert aus n=3)						
		100000 Kopien	10000 Kopien	1000 Kopien	100 Kopien	10 Kopien	1 Kopie	0.1 Kopien
Singleplex	<i>p41</i>	23,45 (3/3)	27,11 (3/3)	30,35 (3/3)	33,61 (3/3)	37,78 (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (6/6)
	<i>ospA</i>	22,26 (3/3)	25,65 (3/3)	28,99 (3/3)	32,48 (3/3)	35,9 (3/3)	39,69 (3/3)	No Ct (6/6)
Duplex	<i>p41</i>	23,27 (3/3)	27,12 (3/3)	30,95 (3/3)	34,28 (3/3)	37,87 (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (6/6)
	<i>ospA</i>	21,41 (3/3)	24,81 (3/3)	28,21 (3/3)	31,57 (3/3)	35,07 (3/3)	38,35 (3/3)	No Ct (6/6)
Triplex	<i>p41</i>	22,45 (3/3)	25,71 (3/3)	29,17 (3/3)	32,82 (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (6/6)
	<i>ospA</i>	21,96 (3/3)	25,62 (3/3)	30,36 (3/3)	34,25 (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (3/3)	No Ct (6/6)

Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass es möglich war das *p41*- und das *ospA*-System miteinander zu kombinieren. Das LOD für den Duplex-Ansatz lag im selben Bereich wie für die einfachen Singleplex-Ansätze, das für den Triplex-Ansatz um eine log-Stufe schlechter.

3.13.4 Effizienzberechnung

Auch für den neuen Duplex- und Triplex-Ansatz wurden jeweils Effizienz, slope und das Bestimmtheitsmaß für einen besseren Vergleich mit kommerziellen Kits berechnet. Die Ergebnisse sind in Tab. 34 aufgeführt.

Tabelle 34: Ergebnisse für die Effizienzberechnung für die Duplex- und Triplex real-time PCR-Ansätze

Assay	Zielgen	Effizienz	Slope	R ²
Singleplex	<i>p41</i>	102,00%	-3.917	0,981
	<i>ospA</i>	96,20%	-3.468	0,999
Duplex	<i>p41</i>	94,00%	-3.637	0,999
	<i>ospA</i>	97,00%	-3.395	1,000
Triplex	<i>p41</i>	94,60%	-3.459	0,999
	<i>ospA</i>	94,80%	-3.654	0,983

Die Effizienz-Ergebnisse lagen in einem optimalen Bereich von 88-110%, ebenso wie die der bereits etablierten Singleplex-Protokolle. Eine schlechtere Performance der neuen Systeme konnte also nicht festgestellt werden, wie schon der LOD-Vergleich gezeigt hatte. Auch die

Werte für den Slope und das Bestimmtheitsmaß lagen in einem sehr guten Bereich und waren vergleichbar mit denen der Singleplex-Ansätze.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Kombination von *p41*- und *ospA*-System ohne Probleme und ohne Einfluss auf die Sensitivität möglich war. Das *ntb2*-System konnte dagegen nur auf Kosten einer Sensitivitätsminderung eingebaut werden.

4. Diskussion

4.1 Zeckenaktivität

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals Daten zur regionalen und lokalen Aktivität von *Ixodes ricinus* unter der besonderen Berücksichtigung abiotischer und biotischer Faktoren an vier verschiedenen Plätzen in Bayern mit unterschiedlichen Ökosystemen.

Insgesamt wurden im Jahr 2011 von März bis November 4513 Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* gesammelt. Durchgängig wurden mehr Nymphen als Adulte gefangen. Larven wurden bis auf eine Ausnahme überraschenderweise nicht registriert, obwohl sie in anderen Studien regelmäßig gefunden werden (Hubalek und Halouzka 1998). Interessanterweise haben auch andere Arbeitsgruppen des VICCI-Projektes in diesem Zeitraum an verschiedenen Sammelgebieten Süddeutschlands kaum Larven gefunden (Dr. Essbauer und Dr. Dobler, Bundeswehr München und Dr. Silaghi, Veterinärmedizin LMU, persönliche Mitteilung). Eine Erklärung für diesen Befund konnte nicht gefunden werden.

Die mittlere Zeckenaktivität variierte zwischen $0/100\text{m}^2$ und $163/100\text{m}^2$. Zum Vergleich: Schwarz et al. (2009) beobachteten im Siebengebirge eine mittlere Aktivität zwischen $0/225\text{m}^2$ und $160/225\text{m}^2$.

Interessanterweise wurden im gesamten NPBW nur zwölf Zecken an acht Sammelterminen gesammelt, entsprechend $0,15$ Zecken/ 100m^2 . Als Grund hierfür sind der fehlende anthropogene Einfluss als auch das spärliche Auftreten anderer Wirte, wie Wildtiere und Vögel, anzunehmen. Sobald außerhalb der Grenzen des Parks abgeflagt wurde, fanden sich signifikant höhere Zahlen von *Ixodes*. Auch Schwarz et al. (2009) konnten in einem geschützten Waldstück vergleichsweise wenige Zecken (10 Zecken/ 225m^2) sammeln.

Die höchste Aktivität wurde zwischen Anfang Mai und Mitte Juni registriert, also unimodal. Zum Vergleich: Im Jahr 2010 wurde ein bimodales Verhalten in Bayern mit Spitzen im Mai und Juni bzw. im August und September festgestellt. Dieses heterogene Bild zeigt sich auch in Europa. Während einige Studien zweigipflige Aktivitätsmaxima registrieren konnten (Bormane et al. 2004, Cadenas et al. 2007, Estrada-Pena et al. 2004, Schwarz et al. 2009), zeigte sich in anderen ebenfalls nur ein eingipfliges (Jouda et al. 2004, Reye et al. 2010, Perret et al. 2004). Grundsätzlich scheinen klimatische Verhältnisse und die Höhe eine entscheidende Rolle im saisonalen Verhalten der Zecken zu spielen. Im Frühsommer 2011 könnte also eine Wetterlage geherrscht zu haben, die die *Ixodes*-Populationen so beeinflusst hat, dass ihre Entwicklung im frühen Herbst nachhaltig beeinträchtigt war (vgl. Daniel et al. 2006). Die Auswertung der Wetterdaten ergab allerdings keinen zwingenden Hinweis darauf. Zumindest im Englischen Garten könnte ein weiterer Grund entscheidend sein: im Sommer

werden die Wiesen von einer Schafherde abgegrast. Somit könnte das optimale Habitat der Zecken verlorengegangen sein.

Von Bedeutung ist aber, dass im Rahmen des VICCI-Projekts eine Zunahme der Zeckenaktivität in Bayern im Verlauf der letzten Jahren festgestellt werden konnte, ebenso in vielen weiteren Ländern Europas (Cadenas et al. 2007, Danielova et al. 2008, Scharlemann et al. 2008). Das Risiko an Lyme-Borreliose zu erkranken ist damit größer geworden.

4.2 Zeckenaktivität und Klima

Das VICCI-Projekt hatte sich zum Ziel gesetzt, die durch den Klimawandel nachhaltig veränderten Bedingungen für die Zecken zu dokumentieren und als Basisdaten für zukünftige longitudinale Studien bereitzustellen. Zusätzlich zu den klimatischen Einflüssen sollten anthropogene Faktoren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die mikroklimatischen Verhältnisse mit Data-Loggern dokumentiert, Wetterdaten vom Deutschen Wetterdienst integriert und eben solche Beprobungspunkte ausgewählt, die die oben genannten Voraussetzungen erfüllten: der Englische Garten, Oberschleißheim und der Bayerwald sind im Gegensatz zum NPBW anthropogen stark beeinflusst; entlang eines Höhengradienten konnten dagegen sehr gut klimatische Verhältnisse dokumentiert werden.

Grundsätzlich ist das Klima eine treibende Kraft in der Entwicklung der Zecken (Estrada-Pena et al. 2012, Estrada-Peña et al. 2013). Es konnte aber gezeigt werden, dass nur die Temperatur mit einer erhöhten Zeckenaktivität positiv korreliert ist (Daniel et al. 2008). Die Luftfeuchtigkeit dagegen scheint einen geringeren Einfluss zu besitzen (Zakovska et al. 2007), während die Bodenfeuchtigkeit als wichtig angesehen wird, um die Zecken vor Austrocknung zu schützen (Schwarz et al. 2009). Allein warme Temperatur reicht aber nicht aus, da zu heiße Verhältnisse die Zecken negativ beeinflussen (Perret et al. 2000).

4.2.1 Zeckenaktivität und Temperatur

Betrachtet man die Temperaturverhältnisse im Jahr 2011, so konnten *Ixodes* in einem Bereich von 10,5 °C bis zu 27 °C gesammelt werden, die meisten über 18 °C. Dies war konform zur vorherrschenden Meinung, dass erst ab einer bestimmten Temperatur eine signifikante Zeckenaktivität zu bemerken ist (Daniel et al. 2006). Nichtsdestotrotz streuten die Temperaturwerte in der vorliegenden Arbeit so weit, dass eine positive Korrelation nicht gefunden werden konnte. Die Ergebnisse von Daniel et al. (2008) konnten somit nicht bestätigt werden.

4.2.2 Zeckenaktivität und Luftfeuchtigkeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zecken bei Luftfeuchtigkeit im Bereich von 35% bis 87% gefangen, viele über 60%. Interessanterweise konnte 2011 – ähnlich zur Temperatur – keine positive Korrelation der Luftfeuchtigkeit mit der Zeckenaktivität beobachtet werden, da auch bei niedrigen Werten eine hohe Anzahl von Zecken gefangen wurde. Wie oben schon bemerkt, ist diese aber auch nicht entscheidend. Genauso wichtig ist die Bodenfeuchtigkeit, die in der vorliegenden Arbeit leider nicht explizit untersucht werden konnte. Grundsätzlich sind die längerfristigen Verhältnisse an einem Sammelort von Bedeutung, um den Zecken ein optimales Habitat zu ermöglichen (Estrada-Pena 2008).

4.2.3 Zeckenaktivität und Beschattung

Einzig die Beschattung hatte einen wesentlichen Einfluss auf die Zeckenaktivität. So wurden v. a. an sehr schattigen Plätzen (>80%) eine besonders hohe Zeckenaktivität beobachtet, der Einfluss war signifikant. In der Literatur wurde dieser Parameter meines Wissens noch nie isoliert betrachtet und stellt damit einen Faktor da, der in künftigen Prävalenzstudien Eingang finden sollte. Hier herrschen optimale Verhältnisse für *Ixodes*, d.h. das Abfliegen solcher Standorte ermöglicht valide Ergebnisse über die Zeckenaktivität in einer Region. Auch bei der Aufklärung über das Risiko von zeckenübertragenen Erkrankungen sollte dieses neue Wissen genutzt werden.

Zusammenfassend muss als Ergebnis des VICCI-Teilprojektes festgehalten werden, dass die allgemeinen Ansichten in der Literatur über Zecken und die vermuteten Auswirkungen des Klimawandels auf ihre Aktivität nicht bestätigt werden konnten. So scheinen *Ixodes ricinus* einen weiten Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbereich tolerieren zu können. Die Gültigkeit dieser Ergebnisse wird allerdings dadurch eingeschränkt, dass die Zeckenaktivität einem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren unterworfen ist, von denen einzelne nicht erfasst werden konnten. Zudem ist der Beobachtungszeitraum von einem Jahr als sehr kurz anzusehen.

4.3 Zeckenaktivität und menschlicher Einfluss

Im Gegensatz zu klimatischen Parametern deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass anthropogenen Faktoren die Zeckenaktivität deutlich verändern. Im Nationalpark Bayerischer

Wald gibt es seit seiner Gründung 1970 keine land- und forstwirtschaftliche Nutzung mehr. Im Rahmen dieser Studie wurden hier eine äußerst niedrige mittlere Zeckenaktivität von $0,15/100\text{m}^2$ beobachtet, während im angrenzenden Bayerischen Wald Spitzenwerte bis $393/100\text{m}^2$ erreicht wurden. Bezeichnenderweise unterliegt diese Region starker land- und forstwirtschaftlicher Nutzung sowie Tourismus. Es ist anzunehmen, dass diese Umstände nicht nur Einfluss auf die klimatischen Bedingungen, sondern auch auf Vegetation und Tiere nehmen. Die landwirtschaftliche Nutzung erhöht nämlich das Nahrungsangebot für Nager, Rotwild und Vögel, die wichtige Wirtstiere für Zecken sind.

Ein weiteres Beispiel für anthropogenen Einfluss auf Zecken ist der Englische Garten. Dieser Stadtpark ist ein beliebtes Naherholungsgebiet und wird viel von den Einwohnern genutzt. Auch hier wurde regelmäßig eine vergleichsweise hohe Zeckenaktivität festgestellt, vermutlich wieder durch ein erhöhtes Wirtstieraufkommen aufgrund Fütterung und Nahrungsmitteln im Abfall. Medlock et al. (2013) konnten dementsprechend in ihrem Review anthropogenen Faktoren ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten von Zecken nachweisen. So mussten zumindest für diese Studie menschlichen Beeinflussungen ein größeres Gewicht als klimatischen Faktoren eingeräumt werden.

4.4 Zeckenaktivität und Höhe über NN

Der Einfluss der Höhe über NN auf die Zeckenaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines Höhengradienten bestimmt. Auch in der Literatur finden sich viele Arbeiten, die diesen Parameter explizit betrachten, gerade weil Zecken aufgrund immer wärmerer Durchschnittstemperaturen in immer höheren Gegenden gefunden werden. Im Jahr 2011 konnten Zecken bis auf 1100 m gefangen werden, mit einer deutlich reduzierten Aktivität ab etwa 760 m. Zudem war keine davon infiziert. Eine mögliche Ursache könnte darin liegen, dass diese Grenze in etwa mit dem den Übergang in den Nationalpark Bayerischer Wald übereinstimmt. Alle Beprobungspunkte oberhalb dieser Höhe lagen im Naturreservat und somit in einem vor anthropologischem Einfluss geschützten Bereich. Hier fehlen Vektoren wie Vögel, die Zecken und damit auch Borrelien in große Höhen transportieren (Jouda et al. 2004). In Studien aus vielen Ländern Europas konnte dagegen ein nachgewiesener Einfluss der Höhe statiert werden (Altobelli et al. 2008, Danielova et al. 2010, Gilbert 2010, Stunzner et al. 2006). Grundsätzlich nahm die Zeckenaktivität mit zunehmender Höhe immer ab, aber es fand sich eine zunehmende Migration von Zecken aller Stadien in großen Höhen und sie waren z.T. auch mit Borrelien infiziert (Cadenas et al. 2007). Allgemein sinken zwar die

Infektionsraten mit Borrelien mit zunehmender Höhe, doch zeigt sich ein Anstieg der Zeckenaktivität möglicherweise aufgrund wärmerer Temperaturen (Danielova et al. 2010).

4.5 Zeckenaktivität und Vegetation

Die Vegetation an fast allen Beprobungspunkten bestand aus Wäldern mit Unterwuchs bzw. Wegrändern mit krautiger und grasartiger Bepflanzung. Studien aus anderen Ländern bestätigen, dass hier die meisten Zecken gesammelt werden können (Altobelli et al. 2008, Lindstrom and Jaenson 2003). Hubalek et al. (2006) konnten sogar statistisch belegen, dass in Waldgebieten eine höhere Zeckendichte als auf freien Flächen zu erwarten ist. In dieser Studie konnten signifikant weniger Zecken gesammelt werden, nachdem der Unterwuchs eines Waldgebietes entfernt worden war.

Im Rahmen des VICCI-Teilprojektes wurde kein Unterschied der Zeckenaktivität zwischen Waldgebieten und Wegrändern gefunden. Dies erscheint logisch, da in beiden Habitaten optimale Voraussetzungen für die Zecke (und auch für den Wirt) herrschen: dichte Bepflanzung, hoher Wuchs und ausreichend Beschattung. Auch wenn im Englischen Garten Wiesenränder und damit vermeintlich ungünstiges Habitat vorherrschte, so zeigte sich auch hier der Einfluss der Vegetation. Als eine Schafherde im Sommer die Flächen und Ränder abgrast hatte, wurde eine deutlich niedrigere Zeckenaktivität beobachtet.

4.6 Zeckenaktivität und Vögel

Vögel sind wichtige Wirte für Zecken und Borrelien (Hanincová K et al. 2003a, Hasle et al. 2011). Mit den bereitgestellten Daten der Nationalparkverwaltung war es möglich den Vogelbestand im Nationalpark und an den anderen Sammelstellen im Bayerischen Wald zu ermitteln. Im geschützten Bereich fanden sich deutlich weniger Vögel und ebenso eine sehr geringe Zeckenaktivität. Daher kann spekuliert werden, dass in diesem geschützten Bereich aufgrund fehlender Wirtsaktivität ein Überleben der Zecken nicht oder nur sehr schwer möglich ist.

Grundsätzlich sind weitere longitudinale Studien vonnöten, um den Einfluss aller oben genannten Parameter weiterhin zu untersuchen.

4.7. Prävalenz von *B. burgdorferi* in *I. ricinus*

4.7.1 Infektionsraten

Die Infektionsraten der Zecken mit Borrelien bewegten sich für Nymphen in einem Bereich von 8,1% bis 19,3% und für Adulte von 16,8% bis 50%. Deutschlandweit finden sich ähnliche Werte: so errechneten Faulde und Robbins (2008) für ein Waldgebiet nahe Koblenz eine Infektionsrate für Nymphen von 9,4% und für Adulte von 33,3% (Männchen) bzw. 56,25% (Weibchen). Kampen et al. (2004) registrierten eine Rate von 12,9% für Nymphen und 21,1% für Imagines. Für den Englischen Garten ist zudem ein Vergleich mit einer früheren Studie möglich (Fingerle et al. 2008). Hier wurde eine Infektionsrate von 37,2% festgestellt, in der vorliegenden Arbeit dagegen nur von 19,5%. Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$). Deutlich weniger *Ixodes* sind also mit Borrelien infiziert, der Englische Garten ist aber, von den hier untersuchten Regionen, immer noch der Beprobungsort mit der zweithöchsten Rate. Hierbei ist interessant zu bemerken, dass die Zeckenaktivität im Vergleich niedrig war. Das deutet darauf hin, dass die diskutierten Einflussfaktoren auch isoliert nur die Borrelienprävalenz beeinflussen können. Somit bleibt dieses beliebte Naherholungsgebiet eine Risikogegend für Lyme-Borreliose.

Betrachtet man weitere Studien aus ganz Europa zeigen sich ebenfalls Übereinstimmungen in den Infektionsraten. So waren entlang eines Höhengradienten in Tschechien 38% der Nymphen, 40% der Weibchen und 14% der Männchen infiziert (Danielova et al. 2004). Im Elsass waren 9-24% der Nymphen und 21-36% der Imagines positiv (Ferquel et al. 2006). Schließlich lag die Infektionsrate für Nymphen in der Slowakei zwischen 1-13% und die der Adulten zwischen 0-28% (Lencakova et al. 2006). Somit lagen die Ergebnisse dieser Arbeit deutschland- und europaweit in Bereich anderer Studien. Des Weiteren zeigte sich, dass Nymphen insgesamt weniger als Adulte mit Borrelien infiziert sind, was allgemein in Europa gilt (Rauter und Hartung 2005).

Dass im NPBW überhaupt keine Zecke infiziert war, dass die Infektionsrate höchstwahrscheinlich von der Dichte einer Population abhängt (Gray et al. 2009). Da in dieser Region eine äußerst niedrige Zeckenaktivität beobachtet wurde, ist die Wahrscheinlichkeit einer Infektion mit Borrelien vernachlässigbar gering.

In Lindau dagegen wurde unter allen Untersuchungsgebieten die höchste Infektionsrate sowohl für Nymphen als auch für Adulte erhoben. Im Jahr 2010 war diese mit 5% noch marginal. Ein Grund mag gewesen sein, dass in Relation zu den anderen Sammelstellen wenige Zecken gesammelt wurden und daher das Ergebnis leicht verzerrt wird. Viel eher

können hier aber standörtliche Faktoren (mikroklimatische Bedingungen, Wirtstierpopulation) gewirkt haben, die im Einzelnen überhaupt nicht erfasst werden können.

Bei so einem Vergleich von Prävalenzen mehrerer Studien muss man allerdings immer die Aufteilung der Zeckenstadien sowie die Gesamtanzahl der untersuchten Zecken und die z. T. unterschiedlichen Nachweismethoden berücksichtigen, da diese Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse haben. Laut Hubalek und Halouzka (1998) aber ist die PCR für Prävalenzstudien die sensitivste Methode.

4.7.2 Verteilung der einzelnen Borrelienspezies

In der Abflagperiode 2011 konnten alle humanpathogenen Spezies detektiert werden. Bei der Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies wurde eine Dominanz von *B. afzelii* an allen Standorten deutlich. Diese Spezies war damit auch die häufigste. Grundsätzlich zeigt *B. afzelii* in Europa eine hohe Prävalenz (Bormane et al. 2004, Ferquel et al. 2006, Reye et al. 2010). Im Vergleich zur Vorgängerstudie (Fingerle et al. 2008) war die Prävalenz aber nahezu verdoppelt; 2008 und in einer noch früheren Arbeit (Fingerle et al. 2004) war sogar *B. garinii* die dominante Spezies. Dies kann z.T. an den unterschiedlichen Untersuchungsverfahren liegen, aber auch an unterschiedlichen Wirtstierpopulationen, die eine kürzere Generationszeit als Zecken aufweisen und so einer hohen Fluktuation unterworfen sind.

Am zweithäufigsten wurde *B. burgdorferi* s.s. angetroffen. Diese Spezies wird in anderen Studien vergleichsweise selten gefunden (Rauter und Hartung 2005). 2008 konnte in Bayern mit 22% aber auch schon ein relativ hohe Prävalenz von *B. burgdorferi* s.s. verzeichnet werden (Fingerle et al. 2008). Zudem zeigen auffälliger Weise Untersuchungen des NRZ Borrelien zur Verteilung von Borrelien in Hirsch-Lymphgewebe aus Bayern (Klier et al. 2012) ausschließlich Infektionen mit dieser Spezies. Ob dafür besondere klimatische Verhältnisse oder das Vorkommen bestimmter Wirtsorganismen verantwortlich sind, konnte abschließend nicht geklärt werden. Bei einer Studie aus der Slowakei wurde die These aufgestellt, dass ein bestimmter Wirt als Filter für eine ebenfalls überraschend hohe Prävalenz von *B. burgdorferi* s.s. wirkt (Lencakova et al. 2006). Ähnliche Verhältnisse scheinen auch in Bayern zu gelten.

Bestätigt werden konnte das gehäufte Vorkommen von *B. spielmanii* im Englischen Garten (Fingerle et al. 2008). An keinem anderen Ort in Bayern konnten sowohl 2008 als auch 2011 so viele Exemplare dieser Genospezies registriert werden.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war die heterogene Verteilung von *B. bavariensis*. So wurde sie im Englischen Garten überhaupt nicht gefunden, in Lindau war sie dagegen die dritthäufigste Spezies. Das mag an methodischen Problemen liegen, da die *hbb* real-time PCR Probleme mit der Unterscheidung von *B. garinii* und *B. bavariensis* aufwies (s. Kap. 3.9). In der Literatur finden sich leider nicht viele Angaben über die Verteilung von *B. bavariensis*, da sie erst vor kurzem entdeckt wurde (Margos et al. 2009). Davor wurde sie als *B. garinii* Serotyp 4 bezeichnet. Die wenigen Studien, die nach Serotypen aufteilen und diese Spezies untersuchen (Lencakova et al. 2006), zeigen Werte von 4-89 % aller *B. garinii* je nach Standort. Somit ist diese Genospezies in Mitteleuropa häufig und es fällt daher auf, dass sie in dieser Arbeit nur relativ selten gefunden wurde. Fingerle et al. (2008) konnten ihr eine enorme klinische Bedeutung nachweisen, da sie die zweithäufigste aus Liquorisolaten kultivierte Spezies war und den häufigsten Serotyp aller *B. garinii*-Isolate darstellte. Diese Werte stellten sich in einer nachträglichen Überprüfung für diese Arbeit als signifikant dar ($p < 0,001$). Grundsätzlich ist es also ein Nachteil dieser Studie, dass *B. garinii* nicht nach Serotypen aufgeteilt wurde, um eine Aussage über deren Verteilung in Bayern zu ermöglichen. Da die *hbb* real-time PCR nur Serotyp 3 und alle anderen nicht weiter unterscheiden kann, wäre eine Nachuntersuchung aller *B. garinii* mit der konventionellen *ospA*-PCR (s. Kap. 2.4.2) sinnvoll.

B. lusitaniae wurde in dieser Studie nicht gefunden, da sie von der *p41* real-time PCR nicht detektiert werden kann. Dies stellte einen Schwachpunkt der Studie dar, da *B. lusitaniae* durchaus in Europa zu finden ist (Rauter und Hartung 2005), am häufigsten allerdings in Südeuropa. Deshalb sind in Bayern niedrige Prävalenzraten zu erwarten. Interessant wäre es allerdings in den nächsten Jahren Zecken auf das Auftreten dieser Spezies zu untersuchen, da in der Folge des Klimawandels ein vermehrtes Auftreten in Mitteleuropa möglich ist.

Ergänzend sei noch erwähnt, dass die Daten für die Spezies *B. garinii* und *B. bavariensis* bzw. *B. spielmanii* und *B. valaisiana* immer unter der Vorbehalt betrachtet werden müssen, dass die *hbb* real-time PCR Unterscheidungsprobleme bei den genannten Spezies aufweisen kann (s. Kap. 3.9). Eine Nachuntersuchung mittels RFLP wäre auch hier wünschenswert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen sehr gut, dass eine genaue Vorhersage der Verteilung der einzelnen Spezies an einer Sammelstelle nahezu unmöglich ist. Der fehlende Nachweis einer bestimmten Spezies schließt aber ihr Vorkommen an einem bestimmten Beprobungspunkt nicht gänzlich aus.

4.7.3 Mehrfachinfektionen

In der Sammelperiode 2011 waren insgesamt 20 Zecken mit mehreren Borrelienspezies gleichzeitig infiziert. Imagines waren deutlich häufiger infiziert, was logisch erscheint, da diese schon zwei Blutmahlzeiten in ihrer Entwicklung hinter sich haben und Borrelien von Zecken normalerweise während einer Blutmahlzeit erworben werden. Grundsätzlich werden Mehrfachinfektionen aber gleich häufig bei Nymphen und Adulten gefunden (Rauter und Hartung 2005). Die häufigste Mehrfachinfektion, die gefunden wurde, war die Kombination aus *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii*, eine Kombination, die in anderen Studien relativ selten gefunden wurde (Kurtenbach et al. 2001, Lencakova et al. 2006). Die Dominanz dieser Genospezies im Jahr 2011 wird dadurch nochmals unterstrichen. Von Interesse ist sicherlich auch, dass *B. valaisiana* im Englischen Garten nur in Mischinfektionen zu finden war, während es 2008 noch die dritthäufigste Spezies war (Fingerle et al. 2008). In den Sammelregionen dieser Studie scheinen also besondere Wirtstierverhältnisse ausschlaggebend zu sein, die bestimmte andere Borrelienspezies begünstigen als die vermeintlich häufigsten (Kurtenbach et al. 2001). Auffallend war, dass die meisten Mischinfektionen in Oberschleißheim und im Englischen Garten zu finden waren; hier ist zusätzlich ein deutlicher anthropogener Einfluss zu vermuten.

4.8 Verbesserung der Diagnostik

Die Diagnostik der Lyme-Borreliose stützt sich z. Zt. weitestgehend auf die Serologie, aber die PCR wird in diesem Bereich immer wichtiger (Stanek et al. 2012, Wilske et al. 2007). In der Frühphase der Erkrankung scheint diese Methode sogar überlegen (Liveris et al. 2012). Gerade deshalb ist es eine wichtige Aufgabe des NRZ Borrelien die Diagnosestellung diese Erkrankung zu verbessern und ggf. in Leitlinien zu verankern. Zu diesem Zweck wurden von Brenauer (2015) verschiedene kommerzielle Kits ausgetestet und ein weiteres in dieser Arbeit, um die Datenlage zu verbessern.

4.8.1 „*B. burgdorferi* real-time“ Kit

Die Evaluierung des Attomol-Kits erbrachte als erstes Ergebnis, dass alle getesteten Spezies detektiert werden konnten. Allerdings ließ sich keine Differenzierung der einzelnen Spezies vornehmen. Ergebnisse lagen für folgende Ansätze und Kits bereits vor: *p41* real-time, Microgen, *ospA* real-time, *hbb* real-time und *ospA* konventionell (Brenauer 2015). Die *p41*

real-time PCR erkannte alle Spezies außer *B. lusitaniae*, aber auch hier konnte keine Differenzierung vorgenommen werden. Somit wurden die Ergebnisse von Schwaiger et al. (2001) bestätigt. Auch das Microgen Kit konnte *B. lusitaniae* nicht detektieren und eine Einteilung in einzelne Spezies war auch hier nicht möglich. Das gleiche galt für die *ospA* real-time PCR. Einzig die *hbb*-PCR konnte beide Fähigkeiten in sich vereinen: Detektion aller Borrelienspezies und Differenzierung aufgrund anschließender Schmelzkurvenanalyse (vgl. hierzu auch Portnoi et al. 2006; Ferdin et al. 2010). Ergänzend zu den Daten von Brenauer (2015) soll noch die Evaluierung eines Kits von TIB Molbio erwähnt werden. Mit diesem war es möglich alle Spezies außer *B. lusitaniae* zu detektieren und zu differenzieren (Wolff und Gerritzen 2011).

Auch weitere publizierte Ansätze bieten sich zum Vergleich an: (Mommert et al. 2001) erreichten mit ihrer Amplifikation des *p66*-Gens und anschließender Schmelzkurvenanalyse eine Differenzierung von *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*. Inwieweit weitere Spezies detektiert werden können ist fraglich, da nur die drei genannten getestet wurden. Auch Rauter et al. (2002) konnten diese drei Spezies mit Schmelzkurven identifizieren. Strube et al. (2010) konnten ihre getesteten Spezies alle erkennen, aber die Differenzierung gelang nur über anschließende Gel-Elektrophorese und damit nicht in einem Zug.

Trotzdem scheint das *fla*-Gen am besten geeignet für die Detektion von Borrelien (Yang et al. 2012). Somit kann das Attomol-Kit durchaus in der klinischen Routine eingesetzt werden. Allerdings wäre eine Spezies-Differenzierung wünschenswert.

Die Bestimmung des LOD zeigte eine nahezu homogene Sensitivität von 10 Kopien pro PCR-Ansatz. Nur *B. garinii* Serotyp 6 wies ein LOD von 100 Kopien auf und kann damit geringfügig schlechter diagnostiziert werden. Dies könnte ein Nachteil sein, da dieser Serotyp ein häufiger Erreger der Neuroborreliose ist (Fingerle et al. 2008). *B. japonica* wies eine noch schlechtere Nachweisgrenze auf (100.000 Kopien), was allerdings kein Nachteil darstellt, da diese Spezies als apathogen gilt (Stanek und Reiter 2011) und fast nur in Asien zu finden ist. Zur Austestung der Sensitivität ist abschließend anzumerken, dass alle Werte mit einer gewissen Unsicherheit belegt sind, da nur 0.1 Kopien sechsfach getestet wurden und nicht alle Stufen, wie es normalerweise gefordert wird (AFNOR 2003). Inwieweit die LOD damit vom wirklichen Wert abweicht, kann nicht beantwortet werden. Es sollten aber nur minimale Varianzen sein, da die Ergebnisse für alle Stämme verlässlich reproduziert wurden.

Ein vergleichsweise besseres LOD hat nur das MicroGene Kit, das bei einigen Spezies eine Sensitivität von 1 Kopie aufweist (Brenauer 2015). Die *p41* real-time PCR und die *ospA* real-time PCR erwiesen sich als nahezu äquivalent zum Attomol Kit. Wolff und Gerritzen (2011),

die ein Kit von TIB Molbio evaluierten, erzielten einen identischen Bereich (1-10 Kopien). Allein die *hbb* real-time PCR wies fast durchgehend ein LOD von 100 Kopien auf und war damit geringfügig schlechter (Portnoi et al. 2006). Sie wurde daher nicht zum Screening eingesetzt, sondern zur Speziesdifferenzierung. Ein weiterer Vergleich zeigt den Vorteil von real-time PCRs in der klinischen Analytik der Lyme-Borreliose: die konventionelle *ospA*-PCR war deutlich unsensitiver, z.T. sogar um zwei log-Stufen (Brenauer 2015).

Die oben schon erwähnten Publikationen zeigten ähnlich gute Sensitivitäten. Rauter et al. (2002) konnten mit ihrem Ansatz 1-10 Kopien nachweisen, ebenso Strube et al. (2010). Interessanterweise konnten Michel et al. (2004) mit einer konventionellen semi-nested PCR ebenfalls solche Werte erreichen. Die Ergebnisse der Sensitivitätstestung zeigen trotzdem erneut, dass das Attomol-Kit für die klinische Routine einsetzbar ist.

Für jeden getesteten Stamm wurde die Effizienz der PCR, slope und Bestimmtheitsmaß berechnet. Die Ergebnisse zeigten eine Effizienz in einem Bereich von 90%-110%, der als optimal für eine PCR gilt (AFNOR 2003). Damit kann davon ausgegangen werden, dass in jedem Zyklus die Ziel-DNA verdoppelt wird. So gesehen sind die Ergebnisse auch nicht rein zufällig entstanden, da das Bestimmtheitsmaß in einem Bereich um 1 liegt.

Die Spezifität des Attomol-Kits wurde mit Hilfe 18 verschiedener Leptospiren und fünf weiteren Verwandten des *B. burgdorferi*-Komplexes ermittelt. Brenauer (2015) verwendet in seiner Arbeit die gleichen Spezifitäten, so dass hier ein guter Vergleich möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde nur *B. hermsii* amplifiziert mit einem LOD von 10000 Kopien. Alle anderen Proben wiesen keinen Cp auf. Dies bedeutet, dass das Attomol-Kit eine sehr hohe Spezifität aufweist und falsch-positive Ergebnisse nahezu ausgeschlossen werden können. Auch die anderen kommerziell erhältlichen Kits weisen eine hohe Spezifität auf (Brenauer 2015). Somit können diagnostische Ergebnisse mit hoher Sicherheit bei typischer Klinik des Patienten und evtl. passender Serologie erwartet werden.

4.8.2 Duplex-und Triplexansatz

Multiplex-Ansätze nehmen in der PCR-Diagnostik mittlerweile einen hohen Stellenwert ein. Egal ob im Lebensmittelbereich (Köppel et al. 2012) oder in der Medizin (Huber et al. 2011) eingesetzt – die Vorteile, allein schon durch die schnellere Detektion mehrerer Gene, sind nicht von der Hand zu weisen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, zwei Multiplex-Ansätze für Diagnostik der Lyme-Borreliose zu designen.

Zur Evaluierung eines Duplex real-time Protokolls wurden für *B. lusitaniae* spezifische *ospA*-Primer designt. Sie zeichneten sich durch eine hohe inklusive und exklusive Spezifität und eine spezifische Produktgröße von 116 Bp aus. Dies wurde durch Testung aller Spezies im *ospA*-Singleplex-Ansatz bestätigt. Eine sichere Detektion von *B. lusitaniae* war somit möglich.

Die Annealing-Temperatur für die Primer konnte auf 54 °C festgelegt werden, da hier sowohl *ospA*- als auch *p41*-System stabile Bande in einer Gradienten-PCR aufwiesen. Nur so konnte von einer sicheren Amplifikation der Zielgene ausgegangen werden. Darauf mussten in mehreren Versuchsreihen sowohl für den Singleplex-Ansatz als auch für den Duplex-Ansatz Primer- und Sondenkonzentrationen titriert werden. Die endgültigen Konzentrationen von 600µM für die *ospA*-Primer und 150µM für die Sonde erwiesen sich als optimal. Im Vergleich zu den Protokollen der einzelnen Systeme sind die einzusetzenden Mengen in den meisten Fällen höher, aber immer noch in einem Bereich liegend, in dem Überstrahlungen und unspezifische Amplifikationen nicht möglich sind (Gill et al. 2000). Günstigerweise konnten die Konzentrationen für das Duplex- und Triplex-Protokoll beibehalten werden. So konnte eine große Homogenität erreicht und – noch viel wichtiger – Vergleiche zwischen Singleplex und Multiplex einfacher gezogen werden.

Die in dieser Arbeit evaluierten Duplex- und Triplex-Ansätze stellen m.W. die erste Beschreibung einer Kombination von *p41*- und *ospA*-System dar. Dies ist eine interessante Tatsache, da viele PCR-Protokolle das *fla*- (Schwaiger et al. 2001, Pahl et al. 1999) oder das *ospA*-Gen (Michel et al. 2004, Moter et al. 1994) als Zielsequenz nützen. Zusätzlich wurde in den Triplex-Ansatz mit *ntb2* eine interne Inhibitionskontrolle eingebaut.

Aufgrund der guten Ergebnisse ließ sich zeigen, dass eine Multiplex-PCR in der Borreliose-Diagnostik durchaus möglich ist. Die auf dem Markt erhältlichen kommerziellen Kits sind größtenteils Singleplex-Ansätze, die entweder durch die Amplifikation eines anderen Gens alle humanpathogenen Spezies erfassen oder auch Lücken im Spektrum der Lyme-Borreliose-Erreger aufweisen. Eine Aussage darüber aber, ob alle Borrelienspezies mit den neuen Ansätzen erfasst werden können, ist nicht möglich, da die Versuche nur mit IP90 und PotiB2 durchgeführt wurden.

Die Bestimmung der Sensitivität zeigte gute Ergebnisse. Das LOD des Duplex-Ansatzes lag im Bereich von 10 bis 1 Kopie. Der Triplex-Ansatz zeigte eine Verschlechterung des LOD um eine log-Stufe, was aber nicht an einer Inhibition der PCR lag. Die regelrechte Amplifizierung der Inhibitionskontrolle *ntb2* bewies diese Tatsache. Vielmehr ist anzunehmen, dass der Vorrat an Nukleotiden im Ansatz zur Amplifikation dreier Gene mit

zunehmender Dauer der PCR erschöpft war. Der Ct von 100 Kopien liegt nämlich bei ca. 34; eine weitere Stufe wäre also problemlos möglich.

Ähnliche LOD-Bereiche erreichten alle getesteten kommerziellen Kits (Brenauer 2015) als auch das Attomol-Kit (s. Kap. 3.12.2). So ist zumindest für den Duplex-Ansatz ein klinischer Einsatz denkbar. Die schlechtere Sensitivität des Triplex-Ansatzes ist allerdings für die Routine ungeeignet. Die Ergebnisse beweisen daher allein, dass unter Hinzunahme eines dritten Zielgens die Amplifikation nicht wesentlich gestört ist. Vielmehr wäre es daher denkbar, *p41*- bzw. *ospA*-Singleplex-PCR mit *ntb2* zu kombinieren, da dieses Plasmid sehr stabil erscheint. Eine interne Inhibitionskontrolle erhärtet die Ergebnisse einer PCR und ist in der Laborroutine von unschätzbarem Vorteil. Zumindest für ein *ospA* real-time Protokoll wurde schon eine Inhibitionskontrolle vorgeschlagen (Gooskens et al. 2006), für die *p41* real-time PCR wäre es wünschenswert. Das Plasmid *ntb2* würde sich hierfür anbieten.

Auch sind die Ansätze den oben schon erwähnten Publikationen in der Sensitivität nicht wesentlich unterlegen. Einen LOD-Bereich von 1 bis 10 Kopien ist durchgängig zu finden (Schwaiger et al. 2001, Rauter et al. 2002, Mommert et al. 2001). Auch Strube et al. (2010) erreichen dieses Niveau, und zwar mit einer Duplex-PCR. Allerdings ist das zweite Zielgen eine Sequenz aus dem *Ixodes*-Genom und dient als Positivkontrolle. Nichtsdestotrotz war eine Verschlechterung in der Sensitivität nicht zu bemerken und beweist einmal mehr die Tatsache, dass Multiplex-PCRs in der Borreliosedagnostik von wichtiger Bedeutung sein können. Gerade die genetische Komplexität von *B. burgdorferi* s.l. (Aguero-Rosenfeld et al. 2005) und die immer weitere Ausbreitung dieses Komplexes durch den Klimawandel machen neue Ansätze in den nächsten Jahren nötig.

Die Effizienz, die slope und das Bestimmtheitsmaß der neu entwickelten Methoden lagen in sehr gutem Bereich. Das bedeutet, dass die Ansätze sicher arbeiteten und die Ergebnisse nicht rein zufällig entstanden sind. Der Triplex-Ansatz scheint aufgrund des Mangels an Nukleotiden einen Sensitivitätsverlust erlitten zu haben. Ein weiterer Hinweis darauf, dass die beiden häufig verwendeten Systeme *p41* und *ospA* nicht in ihrer Performance eingeschränkt werden, zumindest nicht, wenn man ein weiteres Zielgen hinzunimmt.

Ein Schwachpunkt in der Validierung stellt sicher die Tatsache dar, dass die neuen Ansätze nur mit IP90 und PotiB2 ausgetestet wurden. In Anbetracht des immer weiter wachsenden *B. burgdorferi* s.l. Komplexes ist dies natürlich zu wenig, um sichere Aussagen zu treffen, z. B. in der Routine-Diagnostik der Lyme-Borreliose. Weitere Validierungsversuche müssen folgen. Auch wurde keine Spezifität für die neuen Ansätze bestimmt, falsch positive

Ergebnisse konnten damit nicht sicher ausgeschlossen werden, auch wenn die Spezifität der einzelnen Systeme sehr hoch ist (Brenauer 2015)

Dennoch wurde ein Ziel erreicht, indem man die problemlose Kombination von *p41*- und *ospA*-System zeigen konnte. Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da Multiplex-Ansätze in den nächsten Jahren eine große Rolle spielen werden. Ob einer dieser Ansätze zukünftig in der Diagnostik eingesetzt wird, müssen weitere Validierungsversuche zeigen.

5. Zusammenfassung

Der erste Teil dieser Arbeit entstand im Rahmen des VICCI-Projektes „Prospektive Studie zur Entwicklung von *Borrelia burgdorferi* s.l. Spezies in *Ixodes ricinus* in Bayern“, das sich zum Ziel gesetzt hatte, den Einfluss des Klimawandels auf die Zeckenaktivität und den Infektionsstatus mit Borrelien zu untersuchen. Der zweite Teil beschäftigte sich mit der Fragestellung, inwieweit die Diagnostik der Lyme-Borreliose mittels real-time PCR weiter verbessert werden kann.

Zur Beurteilung der Zeckenaktivität wurden im Jahr 2011 in vier verschiedenen Regionen in Bayern standardisiert Zecken abgeflagt. Die Beprobungspunkte wurden anhand der Vegetation, dem möglichen Wirtstiovorkommen und dem anthropogenen Einfluss ausgewählt. Gleichzeitig wurden mit Data-Loggern die mikroklimatischen Bedingungen an den jeweiligen Sammelorten bestimmt. Von den gesammelten Zecken wurde darauf im Labor automatisiert die DNA extrahiert und auf Borrelien mittels *p41* real-time PCR untersucht. Jede positive Zecke wurde mittels *hbb* real-time PCR weiteruntersucht, um die genaue Genospezies zu ermitteln. Proben mit unklaren Ergebnissen wurden zudem sequenziert oder mittels RFLP untersucht. Die Verbesserung der Diagnostik bestand im ersten Schritt darin, ein kommerzielles real-time PCR-Kit (Attomol) auf Sensitivität, Spezifität und Effizienz hin zu validieren, um schon erhobene Daten von anderen erhältlichen Kits zu vervollständigen und einen Vergleichsstandard zu haben. Dieser wurde benötigt, um die in dieser Arbeit designten Multiplex-Ansätze zu evaluieren. In einem Duplex-Ansatz wurden *p41*- und *ospA*-Gen kombiniert, in einem Triplex-Ansatz wurde zudem eine Inhibitionskontrolle (*ntb2*) eingebaut.

Insgesamt konnten im Jahr 2011 4513 Zecken aller Entwicklungsstadien gesammelt werden. Die Zeckenaktivität zeigte einen eingipfeligen Verlauf mit einem Maximum zwischen Mai und Juni. Auffallend war, dass in einem anthropogen nicht beeinflussten Gebiet (NPBW) nur zwölf Zecken an acht Sammelterminen gefangen werden konnten, während an den übrigen Sammelorten Aktivitäten zwischen 0-393/100m² beobachtet wurden. Luftfeuchtigkeit und Temperatur waren mit der Zeckenaktivität überraschenderweise nicht korreliert, während für die Beschattung ein signifikanter Einfluss gefunden werden konnte. Die Infektionsrate mit Borrelien zeigte große Unterschiede zwischen den einzelnen Beprobungspunkten und war in Lindau am höchsten. Signifikant mehr adulte Zecken als Nymphen waren infiziert. Die Untersuchung auf Genospezies erbrachte, dass *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. die

dominierenden Spezies in Bayern sind. Die anderen Arten verteilten sich sehr heterogen auf die einzelnen Sammelorte.

Die Validierung des Attomol-Kits zeigte eine durchschnittliche Sensitivität von 10 Genomkopien pro PCR-Ansatz, nur *B. garinii* Serotyp 6 wies ein LOD von 100 Kopien auf. Die Spezifität lag bei nahezu 100% und die Effizienz bewegte sich in einem Bereich von 90-110%. Auch der neu designte Duplex-Ansatz erreichte ein LOD von 1-10 Kopien, während der Triplex-Ansatz eine log-Stufe schlechter lag. Die Effizienz für beide Systeme lag in einem sehr guten Bereich.

So konnten einerseits im Rahmen des VICCI-Projektes wertvolle Basisdaten für weitere longitudinale Studien, die die Beziehung Klimawandel und Zecken untersuchen, gewonnen werden, andererseits die Diagnostik der Lyme-Borreliose verbessert werden, indem zwei Multiplex-Ansätze evaluiert wurden, da solche Ansätze in der Zukunft eine größere Rolle im klinischen Alltag spielen werden.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hallersche Organe.....	2
Abbildung 2: Prinzip der PCR	7
Abbildung 3: Prinzip des TaqMan-Modells	9
Abbildung 4: Prinzip der Molecular beacons	9
Abbildung 5: Karte Beprobungsorte in Bayern.....	12
Abbildung 6: Darstellung der mittleren Zeckenaktivität aller Sammelgebiete im Jahr 2011.....	40
Abbildung 7: Darstellung der Zeckenanzahl in Abhängigkeit von der Temperatur.....	41
Abbildung 8: Darstellung der Zeckenanzahl in Abhängigkeit von der Luftfeuchtigkeit.....	41
Abbildung 9: Darstellung des Einflusses von Höhe auf die Zeckenaktivität.....	42
Abbildung 10: Amplifikationskurven einer <i>p41</i> real-time PCR.....	44
Abbildung 11: Schmelzkurven der Positivkontrollen in der <i>hbb</i> real-time PCR.....	45
Abbildung 12: Beispiel für eine Mischinfektion.....	45
Abbildung 13: gel-like picture von PCR-Produkten aus der <i>ospA</i> semi-nested PCR.....	47
Abbildung 14: Abgebildet ist das Gelbild einer Elektrophorese nach RFLP-Verdau.....	48
Abbildung 15: Peaks einer Sequenzierung	49
Abbildung 16: Infektionsraten der Zecken – aufgeschlüsselt nach Nymphen und Adulten – mit Borrelien ..	50
Abbildung 17: Infektionsraten der Zecken – aufgeschlüsselt nach Nymphen und Adulten – mit Borrelien an den einzelnen Probenorten im Bayerischen Wald.....	51
Abbildung 18: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies an den vier Sammelorten dar.....	52
Abbildung 19: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies im Bayerischen Wald.....	52
Abbildung 20: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies auf Nymphen und Adulte.....	53
Abbildung 21: Verteilung der unterschiedlichen Borrelienspezies auf Nymphen und Adulte im Bayerischen Wald.....	54
Abbildung 22: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe zur Austestung des Kit „B. burgdorferi real-time“ (Attomol).....	56
Abbildung 23: Amplifikationskurven des internen Standards des Kit „B. burgdorferi real-time“ ..	56
Abbildung 24: gel-like picture des PCR-Produkts aus einem <i>ospA</i> -Singleplex-Ansatz.....	60
Abbildung 25: gel-like picture der Robustheitstestung für die <i>ospA</i> - und <i>p41</i> -Primer.....	61
Abbildung 26: Bild Sondentitrierung	61
Abbildung 27: Ergebnisse des Duplex-Ansatzes.....	65
Abbildung 28: Ergebnisse des Triplex-Ansatzes	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antibiotische Therapie der verschiedenen Manifestationen der Lyme-Borreliose	6
Tabelle 2: Mastermixzusammensetzung der BioSprint DNA-Extraktion	14
Tabelle 3: Beschickung der einzelnen Platten für die BioSprint DNA-Extraktion	14
Tabelle 4: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde für die <i>p41</i> real-time PCR	15
Tabelle 5: Mastermixzusammensetzung der <i>p41</i> real-time PCR	16
Tabelle 6: Temperaturprofil der <i>p41</i> real-time PCR	17
Tabelle 7: Primer und Sonde der <i>hbb</i> real-time PCR	18
Tabelle 8: Reaktionsansatz für die <i>hbb</i> real-time PCR	18
Tabelle 9: Temperaturprofil der <i>hbb</i> real-time PCR	19
Tabelle 10a: Verwendete Primersequenzen der <i>ospA</i> -PCR; Primäramplifikation	21
Tabelle 10b: Verwendete Primersequenzen für die <i>ospA</i> -PCR; Sekundäramplifikation	18
Tabelle 11a: Ansatz der <i>ospA</i> semi-nested PCR; Primäramplifikation	22
Tabelle 11b: Ansatz der <i>ospA</i> semi-nested PCR; Sekundäramplifikation	20
Tabelle 12: Temperaturprofil der <i>ospA</i> semi-nested PCR für beide Amplifikationen	23
Tabelle 13: RFLP-Muster	24
Tabelle 14: Ansatz der RFLP-Reaktion	25
Tabelle 15: Reaktionsansatz der Sequenzier-PCR	28
Tabelle 16: Temperaturprofil der Sequenzier-PCR	28
Tabelle 17: Borrelienstämme für die Sensitivitätstestung	30
Tabelle 18: Reaktionsansatz der Attomol real-time PCR	32
Tabelle 19: Temperaturprofil der Attomol real-time PCR	33
Tabelle 20: Liste der Leptospirenstämme zur Spezifitätstestung des Attomol-Kits	34
Tabelle 21: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonde zur Detektion von <i>B. lusitaniae</i>	35
Tabelle 22: Spezifische Primer und Sonden des ntb2-Systems	37
Tabelle 23: Verteilung der Zecken auf die unterschiedlichen Sammelorte im Jahr 2011	39
Tabelle 24: Häufigkeit, Kombinationen und Verteilung der Mehrfachinfektionen	55
Tabelle 25: Das LOD der einzelnen Borrelienstämme	57
Tabelle 26: Ergebnisse der Effizienz-Berechnung für das Attomol-Kit	57
Tabelle 27: Ergebnisse der Spezifitätstestung für das Attomol-Kit	58
Tabelle 28: Mastermixzusammensetzung der <i>ospA</i> Singleplex-PCR	59
Tabelle 29: Temperaturprofil der <i>ospA</i> Singleplex PCR	59
Tabelle 30: Mastermixzusammensetzung der Duplex real-time PCR	62
Tabelle 31: Temperaturprofil der Duplex real-time PCR	63
Tabelle 32: Mastermixzusammensetzung der Triplex real-time PCR	63
Tabelle 33: Ergebnisse der Validierung der Duplex und Triplex real-time PCR-Ansätze	67
Tabelle 34: Ergebnisse für die Effizienzberechnung für die Duplex- und Triplex real-time PCR-Ansätze ...	67

Literaturverzeichnis

AFNOR Standard XP-V03-020-2 (2003) Détection et quantification des organismes végétaux génétiquement modifiés et produits dérivés. Partie 2: Méthodes basées sur la réaction de polymérisation en chaîne: 1–20.

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP (2005) Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(3): 484–509.

Alekseev AN, Dubinina HV (2000) Abiotic parameters and diel and seasonal activity of *Borrelia*-infected and uninfected *Ixodes persulcatus* (Acarina: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 37 (1), S. 9–15.

Altobelli A, Boemo B, Mignozzi K, Bandi M, Floris R, Menardi G, Cinco M (2008) Spatial Lyme borreliosis risk assessment in north-eastern Italy. *International Journal of Medical Microbiology* 298: 125–128.

Anderson A, Pietsch K, Zucker R, Mayr A, Müller-Hohe E, Messelhäusser U, Sing A, Busch U, Huber I (2010) Validation of a Duplex real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in different food products. *Food Analytical Methods* 4(3): 259–267.

Anderson JF (1989) Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis* 11 Suppl 6, S. S1451-9.

Barbour AG (1988) Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* 26(3): 475–478.

Barbour AG, Garon CF (1987) Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science* 237(4813): 409–411.

Barbour AG, Hayes SF (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50(4): 381–400

Barbour AG (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57 (4), S. 521–525.

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.

Brenauer J (2015) Evaluierung von PCR-Systemen zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mit Prävalenzuntersuchungen zum Hauptvektor *Ixodes ricinus* und dessen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Infektionsrate entlang eines Höhengradienten in Ostbayern.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoersdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B (2004) Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10(12): 1108–1132.

- Burgdorfer W (1984) Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* 57(4): 515–520.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme disease—a tick borne spirochetosis? *Science* 216(4552): 1317–1319.
- Cadenas FM, Rais O, Jouda F, Douet V, Humair PF, Moret J, Gern L (2007) Phenology of *Ixodes ricinus* and Infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato Along a North- and South-Facing Altitudinal Gradient on Chaumont Mountain, Switzerland. *J Med Entomol* 44(4): 683–693.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85(23):8790-4
- Casjens S, Delange M, Ley H, Rosa P, Huang WM (1995) Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *Journal of Bacteriology* 177(10): 2769–2780.
- Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM (2000) A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 35(3): 490–516.
- Cekanac R, Pavlovic N, Gledovic Z, Grgurevic A, Stajkovic N, Lepsanovic Z, Ristanovic E (2010) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Belgrade area. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(5): 447–452.
- Cisak E, Wojcik-Fatla A, Stojek N, Chmielewska-Badora J, Zwolinski J, Buczek A, Dutkiewicz J (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 13(2): 301–306.
- Coipan EC, Vladimirescu AF (2010) First report of lyme disease spirochetes in ticks from Romania (Sibiu County). *Exp Appl Acarol* 52(2): 193–197.
- Coipan EC, Vladimirescu AF (2011) *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae): vectors for Lyme disease spirochetes in Romania. *Exp Appl Acarol* 54(3): 293–300.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C (2004) First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* 42(3): 1316–1318.
- Daniel M, Danielova V, Kriz 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(5): 327–328.
- Daniel M, Kriz B, Danielova V, Materna J, Rudenko N, Holubova J, Schwarzova L, Golovchenko M (2005) Occurrence of ticks infected by tickborne encephalitis virus and *Borrelia* genospecies in mountains of the Czech Republic. *Euro Surveill* 10(13).

- Daniel M, Kriz B, Danielova V, Valter J, Benes C (2009) Changes of meteorological factors and tick-borne encephalitis incidence in the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 58(4): 179–187.
- Daniel M, Kriz B, Danielova V, Valter J, Kott I (2008) Correlation between meteorological factors and tick-borne encephalitis incidence in the Czech Republic. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: 97-107.
- Daniel M, Materna J, Honig V, Metelka L, Danielova V, Harcarik J, Kliegrova S, Grubhoffer L (2009) Vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne pathogens in the northern Moravian mountains correlated with climate warming (Jeseniky Mts., Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 17(3): 139–145.
- Daniel M, Vrablik T, Valter J, Kriz B, Danielova V (2010) The TICKPRO computer program for predicting *Ixodes ricinus* host-seeking activity and the warning system published on websites. *Cent Eur J Public Health* 18(4): 230–236.
- Daniel M, Zitek K, Danielova V, Kriz B, Valter J, Kott I (2006) Risk assessment and prediction of *Ixodes ricinus* tick questing activity and human tick-borne encephalitis infection in space and time in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40: 41–47.
- Danielova V, Daniel M, Rudenko N, Golovchenko M (2004) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in selected South Bohemian locations (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 12(3): 151–156.
- Danielova V, Daniel M, Schwarzova L, Materna J, Rudenko N, Golovchenko M, Holubova J, Grubhoffer L, Kilian P (2010) Integration of a tick-borne encephalitis virus and *Borrelia burgdorferi* sensu lato into mountain ecosystems, following a shift in the altitudinal limit of distribution of their vector, *Ixodes ricinus* (Krkonose mountains, Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(3): 223–230.
- Danielova V, Kliegrova S, Daniel M, Benes C (2008) Influence of climate warming on tickborne encephalitis expansion to higher altitudes over the last decade (1997-2006) in the Highland Region (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 16(1): 4–11.
- Estrada-Pena A (2008) Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S87-95.
- Estrada-Pena A, Ayllón N, La Fuente J de (2012) Impact of Climate Trends on Tick-Borne Pathogen Transmission. *Front. Physio* 3:64.
- Estrada-Pena A, Martinez JM, Sanchez Acedo C, Quilez J, Del Cacho E (2004) Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med Vet Entomol* 18(4): 387–397.
- Estrada-Pena A, Ortega C, Sanchez N, Desimone L, Sudre B, Suk JE, Semenza JC (2011) Correlation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks with specific abiotic traits in the Western Palearctic. *Appl Environ Microbiol* 77(11): 3838–3845.
- Estrada-Pena A, Santos-Silva MM (2005) The distribution of ticks (Acari: Ixodidae) of domestic livestock in Portugal. *Exp Appl Acarol* 36(3): 233–246.

- Estrada-Pena A, Venzal JM (2007) A GIS framework for the assessment of tick impact on human health in changing climate. *Geospatial Health* 1(2): 157–168.
- Estrada-Pena A, Venzal JM (2007) Climate niches of tick species in the Mediterranean region: modeling of occurrence data, distributional constraints, and impact of climate change. *J Med Entomol* 44(6): 1130–1138.
- Estrada-Pena A, Venzal JM, Sanchez AC (2006) The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. *Med Vet Entomol* 20(2): 189–197.
- Estrada-Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM (2013) Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:29.
- Faulde MK, Robbins RG (2008) Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp Appl Acarol* 44(2): 137–145.
- Ferdin J, Cerar T, Strle F, Ruzic-Sabljić E (2010) Evaluation of real-time PCR targeting *hbb* gene for *Borrelia* species identification. *J Microbiol Methods* 82(2): 115–119.
- Ferdows MS, Barbour AG (1989) Megabase-sized linear DNA in the bacterium *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(15): 5969–5973.
- Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernede-Bauduin C, Baranton G, Perez-Eid C, Postic D (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasmataceae* members in *Ixodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. *Appl Environ Microbiol* 72(4): 3074–3078.
- Fingerle V, Bergmeister H, Liegl G, Vanek E, Wilske B (1994) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. *J Spiroch Tick Dis* 1(2): 41-45.
- Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B (1995) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol* 33(7): 1867–1869.
- Fingerle V, Klier C, Liebl B, Sing A, Wildner M, Wilske B (2011) Lyme-Borreliose: Wissenswertes zum Vektor und die mikrobiologische Diagnostik. *Der Mikrobiologe* 21: 83-92.
- Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B (2000) Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol* 189(2): 59–66.
- Fingerle V, Liegl G, Munderloh UG, Wilske B (1998) Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Med Microbiol Immunol*, 1998. 187(2): 121-6.
- Fingerle V, Michel H, Hettche G, Hizo-Teufel C, Wilske B (2004) *Borrelia burgdorferi* s.l. *ospA*-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 165–166.

- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B (1999) Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* 188(3): 145–149.
- Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B (2002) Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J Clin Microbiol* 40(4): 1456–1463.
- Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B (2008) Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol* 298(3-4): 279–290.
- Fingerle V, Sing A, Klier C, Brenauer J, Hizo-Teufel C, Stockmeier S, Strehle W, Teußer LM (2013) Prospektive Studie zur Entwicklung von *Borrelia burgdorferi* s.l. Spezies in *Ixodes ricinus* in Bayern
http://www.lgl.bayern.de/das_lgl/forschung/forschung_interdisziplinaer/fp_vicci_projekt1_all_bericht.htm. Letzter Zugriff 12.03.2015
- Fingerle V, Wilske B (2006) Epidemiologische Aspekte zeckenübertragener Erkrankungen in Bayern: Lyme-Borreliose im Rahmen der Gesundheitsinitiative "Bayern aktiv".
http://www.stmug.bayern.de/gesundheit/aufklaerung_vorbeugung/vorsorge/doc/borreliose.pdf
Letzter Zugriff 12.11.2014.
- Fingerle V, Wilske B (2007) Mikrobiologische Diagnostik der Lyme-Borreliose. *J Lab Med* 31(3): 141–148.
- Franke J, Hildebrandt A, Meier F, Straube E, Dorn W (2011) Prevalence of Lyme Disease Agents and Several Emerging Pathogens in Questing Ticks from the German Baltic Coast. *Journal of Medical Entomology* 48(2): 441–444.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390(6660): 580–586.
- Furlanello C, Neteler M, Merler S, Menegon S, Fontanari S, Donini A, Rizzoli A, Chemini C (2003) GIS and the Random Forest Predictor: Integration in R for Tick-Borne Disease Risk Assessment. Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing (DSC 2003), March 20–22, Vienna, Austria.
<http://www.ci.tuwien.ac.at/Conferences/DSC-2003/>. Letzter Zugriff 12.03.2015.
- Gatewood A, Liebman K, Vourc'h G, Bunikis J, Hamer S, Cortinas R, Melton F, Cislo P, Kitron U, Tsao J, Barbour A, Fish D, Diuk-Wasser M (2009) Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Appl Environ Microbiol* 75(8): 2476–2483.

- Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA (1998) European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zentralbl Bakteriologie 287(3): 196–204.
- Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J (1999) Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from Ixodes ricinus ticks collected in Slovakia. Eur J Epidemiol 15(7): 665–669.
- Gilbert L (2010) Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? Oecologia (162): 217–225.
- Gill P, Sparkes R, Fereday L, Werrett DJ (2000) Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENSFI): formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes. Forensic Sci. Int 108(1): 1–29.
- Gooskens J, Templeton KE, Claas EC, van Dam AP (2006) Evaluation of an internally controlled real-time PCR targeting the *ospA* gene for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in cerebrospinal fluid. Clin Microbiol Infect 12(9): 894–900.
- Gray JS (2008) Ixodes ricinus seasonal activity: Implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. International Journal of Medical Microbiology 298: 19–24.
- Gray JS, Dautel H, Estrada-Pena A, Kahl O, Lindgren E (2009) Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip Perspect Infect Dis, vol. 2009.
- Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G (2010) Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. Appl Environ Microbiol 76(13): 4413–4420.
- Halperin JJ, Shapiro ED, Logigian E, Belman AL, Dotevall L, Wormser GP, Krupp L, Gronseth G, Bever CT (2007) Practice Parameter: Treatment of nervous system Lyme disease (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology 69(1): 91–102.
- Hanincová K, Taragelová V, Koci J, Schäfer SM, Hails R, Ullmann AJ, Piesman J, Labuda M, Kurtenbach K (2003) Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl Environ Microbiol 69(5): 2825–2830.
- Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M and Kurtenbach K (2003) Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. Parasitology 126: 11–20.
- Hasle G, Bjune GA, Midthjell L, Roed KH, Leinaas HP (2011) Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. Ticks Tick Borne Dis 2(1): 37–43.
- Herrmann C, Gern L (2010) Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. Journal of Medical Entomology 47(6): 1196–1204.

- Herzer P, Fingerle V, Pfister H, Krause A (2014) Lyme-Borreliose. *Internist* 55(7): 789-804
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V (2003) Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22(6): 364–367.
- Hubalek Z, Halouzka J (1998) Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res* 84(3): 167–172.
- Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z, Sikutova S, Rudolf I (2006) Effect of forest clearing on the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. *Med Vet Entomol* 20(2): 166–172.
- Huber I, Campe H, Sebah D, Hartberger C, Konrad R, Bayer M, Busch U, Sing A (2011) A multiplex one-step real-time RT-PCR assay for influenza surveillance. *Euro Surveill* 16(7).
- Hügli D, Moret J, Rais O, Moosmann Y, Erard P, Malinverni R, Gern L (2009) Tick bites in a Lyme borreliosis highly endemic area in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology* 299(2): 155–160.
- Jaenson TG, Eisen L, Comstedt P, Mejlom HA, Lindgren E, Bergstrom S, Olsen B (2009) Risk indicators for the tick *Ixodes ricinus* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Sweden. *Med Vet Entomol* 23(3): 226–237.
- Jaenson TG, Jaenson DG, Eisen L, Petersson E, Lindgren E (2012) Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 5:8.
- Jaenson TG, Lindgren E (2011) The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks Tick Borne Dis* 2(1): 44–49.
- Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM (1984) Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 57(4): 529–537.
- Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Sys Bacteriol* 34: 483–497.
- Jore S, Viljugrein H, Hofshagen M, Brun-Hansen H, Kristoffersen AB, Nygard K, Brun E, Ottesen P, Saevik BK, Ytrefhus B (2011) Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasit Vectors* 4:84.
- Jouda F, Perret JL, Gern L (2004) *Ixodes ricinus* density, distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J Med Entomol* 41(2): 162–169.
- Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, Boer R de (1998) Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl Bakteriol* 287(1-2): 41–52.

- Kaiser R, Fingerle V (2009) Neuroborreliose. *Nervenarzt* 80(10): 1239–1251.
- Kampen H, Rötzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM (2004) Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* 70(3): 1576–1582.
- Kesteman T, Rossi C, Bastien P, Brouillard J, Avesani V, Olive N, Martin P, Delmee M (2010) Prevalence and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes* ticks in Belgium. *Acta Clin Belg* 65(5): 319–322.
- Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A (2010) *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway. *Acta Vet Scand* 52: 59.
- Kjelland V, Stuen S, Skarpaas T, Slettan A (2010) Prevalence and genotypes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in southern Norway. *Scand J Infect Dis* 42(8): 579–585.
- Klier C, Brenauer J, Gerstmair E, Fleischer B, Niedrig M, Schulze Y, Sing A, Fingerle V (2012) DNA bank from red deer tissues as source for future sentinel studies on emerging zoonotic and vector borne pathogens. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Heidelberg, 14-17.3.2012, P29.
- Kobryn K, Naigamwalla DZ, Chaconas G (2000) Site-specific DNA binding and bending by the *Borrelia burgdorferi* Hbb protein. *Mol. Microbiol.* 37(1): 145–155.
- Koeppel R, Eugster A, Ruf J, Rentsch J (2012) Quantification of meat proportions by measuring DNA contents in raw and boiled sausages using matrix-adapted calibrators and multiplex real-time PCR. *J AOAC Int* 95(2): 494–499.
- Krause A, Fingerle V (2009) Lyme-Borreliose. *Z. Rheumatol.* 68(3): 239–254.
- Kurtenbach K, de Michelis S., Sewell H-S., Etti S., Schafer SM, Hails R., Collares-Pereira M, Santos-Reis M., Hanincova K., Labuda M., Bormane A, Donaghy M. (2001) Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4926–4929.
- Kurtenbach K, Peacey M, Rijpkema SG, Hoodless AN, Nuttall PA, Randolph SE (1998) Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* 64(4): 1169-74.
- Kybicová K, Kurzová Z, Hulínská D (2008) Molecular and serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in wild rodents in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8(5): 645–652.
- Lencakova D, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel UC, Stanko M, Wilske B, Fingerle V (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. *ospA* types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol* 296 Suppl 40: 108–118.

- Leonhard S (2005) Untersuchungen zur Häufigkeit von *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* aus Bayern und Baden-Württemberg. http://edoc.ub.uni-muenchen.de/5661/1/Leonhard_Sarah.pdf. Letzter Zugriff 12.03.2015
- Lindgren E, Talleklint 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(2): 119–123
- Lindstrom A, Jaenson TG (2003) Distribution of the common tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in southern Sweden. *J Med Entomol* 40(4): 375–378
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6): 357–62.
- Liveris D, Schwartz I, McKenna D, Nowakowski J, Nadelman R, Demarco J, Iyer R, Bittker S, Cooper D, Holmgren D, Wormser GP (2012) Comparison of five diagnostic modalities for direct detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with early Lyme disease. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 73(3): 243–245
- Maetzel D, Maier WA, Kampen H. (2005) *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitol Res* 95(1): 5–12.
- Maiwald M., Oehme R., March O., Petney T.N., Kimmig P., Naser K., Zappe H.A., Hassler D. and von Knebel Doeberitz M. (1998) Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* to humans in southwest Germany. *Epidemiol Infect* 121: 103–108
- Mannelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J (2011) Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev*.
- Mantelli B, Pecchioli E, Hauffe HC, Rosa R, Rizzoli A (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25(11): 737–739.
- Margos G, Hojgaard A, Lane RS, Cornet M, Fingerle V, Rudenko N, Ogden N, Aanensen DM, Fish D, Piesman J (2010) Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis* 1(4): 151–158.
- Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K (2009) A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 75(16): 5410–5416.
- Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D (2011) Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 11(7): 1545–1563.

- Materna J, Daniel M, Danielova V (2005) Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). *Cent Eur J Public Health* 13(1): 24–28
- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Pena A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, van Bortel W (2013) Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 6(1).
- Medlock JM, Pietzsch ME, Rice NV, Jones L, Kerrod E, Avenell D, Los S, Ratcliffe N, Leach S, Butt T (2008) Investigation of ecological and environmental determinants for the presence of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on Gower, South Wales. *J Med Entomol* 45(2): 314–325.
- Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V (2004) An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and *ospA* types. *Med Microbiol Immunol* 193(4): 219–226.
- Milutinović M, Masuzawa T, Tomanović S, Radulović Ž, Fukui T, Okamoto Y (2008) *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp Appl Acarol* 45(3-4): 171–183.
- Mommert S, Gutzmer R, Kapp A, Werfel T (2001) Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 39(7): 2663–2667.
- Moter SE, Hofmann H, Wallich R, Simon MM, Kramer MD (1994) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by *ospA*-specific PCR. *J. Clin. Microbiol* 32(12): 2980–2988.
- Mygland Å, Ljostad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I (2010) EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology* 17(1): 8–16.
- Nazzi F, Martinelli E, Del Fabbro S, Bernardinelli I, Milani N, Iob A, Pischiutti P, Campello C, D'Agaro P (2010) Ticks and Lyme borreliosis in an alpine area in northeast Italy. *Med Vet Entomol* 24(3): 220–226.
- Needham GR, Teal PD (1991) Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annu Rev Entomol* 36: 659–681.
- Pahl A, Kühlbrandt U, Brune K, Röllinghoff M, Gessner A (1999) Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol* 37(6): 1958–1963.
- Pecchioli E, Hauffe HC, Tagliapietra V, Bandi C, Genchi C, Rizzoli A (2007) Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from the Autonomous Province of Trento, Italy. *Int J Med Microbiol* 297(1): 53–59.

- Pejchalova K, Zakovska A, Mejzlikova M, Halouzka J, Dendis M (2007) Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic. *Ann Agric Environ Med* 14(1): 75–79.
- Perret JL, 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(7): 554–557.
- Perret JL, Rais O, Gern L (2004) Influence of climate on the proportion of *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population. *J Med Entomol* 41(3): 361–365.
- Pichon B, Mousson L, Figureau C, Rodhain F, Perez-Eid C (1999) Density of deer in relation to the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* nymphs in Rambouillet forest, France. *Experimental & Applied Acarology* 23(3): 267–275.
- Pietzsch ME, Medlock JM, Jones L, Avenell D, Abbott J, Harding P, Leach S (2005) Distribution of *Ixodes ricinus* in the British Isles: investigation of historical records. *Med Vet Entomol* 19(3): 306–314.
- Plch J, Basta J (1999) Incidence of spirochetes (*Borrelia* sp.) in the tick *Ixodes ricinus* in the urban environment (capital of Prague) between 1994-1997. *Zentralbl Bakteriol* 289(1): 79–88.
- Portnoi D, Sertour N, Ferquel E, Garnier M, Baranton G, Postic D (2006) A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence. *FEMS Microbiol Lett* 259(1): 35–40.
- Preac-Mursic V, Wilske B (1993) Biology of *Borrelia burgdorferi*. In: Weber K., Burgdorfer W (eds) *Aspects of Lyme Borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 44–58.
- Randolph SE (2001) The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1411): 1045–1056.
- Randolph SE (2004) Evidence that climate change has caused 'emergence' of tick-borne diseases in Europe? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 5–15.
- Randolph SE (2004) Faune, climat et politique: causes possibles aux récents accroissements des zoonoses à tiques. *Arch Pediatr* 11(10): 1282-1285.
- Randolph SE (2009) Perspectives on climate change impacts on infectious diseases. *Ecology* 90(4): 927–931.
- Randolph SE (2010) To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? *Vet Parasitol* 167(2-4): 92–94.
- Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF (2002) An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 32(8): 979–989.
- Rauter C, Hartung T (2005) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 71(11): 7203–7216.

- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T (2002) Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40(1): 36–43.
- Reischl U (2011) Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT), 3. Auflage. Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards, Vol 1. Urban & Fischer, München.
- Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP (2010) Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol* 76(9): 2923–2931.
- Richter D, Debski A, Hubalek Z, Matuschka FR (2012) Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12(1): 21–27.
- Rizzoli A, Merler S, Furlanello C, Genchi C (2002) Geographical Information Systems and Bootstrap Aggregation (Bagging) of Tree-Based Classifiers for Lyme Disease Risk Prediction in Trentino, Italian Alps. *Journal of Medical Entomology* 39(3): 485–492.
- Robert Koch-Institut (RKI) Epidemiologisches Bulletin 12/2010. http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/12_10.pdf?__blob=publicationFile. Letzter Zugriff 12.03.2015
- Rogers DJ, Randolph SE (2006) Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol* 62: 345–381.
- Rosa PA, Schwan TG (1989) A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 160(6): 1018–1029.
- Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J (2009) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta Vet Scand* 51: 47.
- Ruiz-Fons F, Fernandez-de-Mera IG, Acevedo P, Gortazar C, de la Fuente J (2012) Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl Environ Microbiol* 78(8).
- Rupprecht TA, Lechner C, Tumani H, Fingerle V (2014) CXCL13 als Biomarker der akuten Neuroborreliose. *Nervenarzt* 85(4): 459-64
- Rupprecht TA, Pfister HW, Angele B, Kastenbauer S, Wilske B, Koedel U (2005) The chemokine CXCL13 (BLC): a putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology* 65(3): 448–450.
- Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* 18(21): 6409–6412.
- Saidac DS, Marras SA, Parveen N. (2009) Detection and quantification of Lyme spirochetes using sensitive and specific molecular beacon probes. *BMC Microbiology* 9(43).

- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350–1354.
- Sanger F, Coulson AR, Friedmann T, Air GM, Barell BG, Brown NL, Fiddes JC, Hutchison III CA, Slocombe PM, Smith M (1978) The Nucleotide Sequence of Bacteriophage ϕ 174. *J Mol Biol* 125: 225–246.
- Scharlemann JP, Johnson PJ, Smith AA, Macdonald DW, Randolph SE (2008) Trends in ixodid tick abundance and distribution in Great Britain. *Med Vet Entomol* 22(3): 238–247.
- Schmidt BL (1997) PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(1): 185–201.
- Schmidt C, Plate A, Angele B, Pfister H, Wick M, Koedel U, Rupprecht TA (2011) A prospective study on the role of CXCL13 in Lyme neuroborreliosis. *Neurology* 76(12): 1051–1058.
- Schröder W, Schmidt G (2008) Spatial modelling of the potential temperature-dependent transmission of vector-associated diseases in the face of climate change: main results and recommendations from a pilot study in Lower Saxony (Germany). *Parasitol Res* 103 Suppl 1: S55-63.
- Schwaiger M, Peter O, Cassinotti P (2001) Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin Microbiol Infect* 7(9): 461–469.
- Schwan TG, Piesman J (2000) Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J Clin Microbiol* 38(1): 382–388.
- Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(7): 2909–2913.
- Schwarz A, Maier WA, Kistemann T, Kampen H. (2009) Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *Int J Hyg Environ Health* 212(1): 87–96.
- Sint D, Raso L, Traugott M (2012) Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution* 3(5): 898–905.
- Skroka J, Szymanska J, Wojcik-Fatla A (2009) The Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Poland with the use of PCR. *Ann Agric Environ Med* 16: 313–319.
- Smetanova K, Burri C, Perez D, Gern L, Kocianova E (2007) Detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in ticks from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr* 119(17-18): 534–537.
- Sonenshine DE and Roe RM (1993) *Biology of ticks* Vol. 2, Oxford University Press, New York.

- Stanek G, Fingerle V, Hunfeld K, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J (2011) Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 17(1): 69–79.
- Stanek G, Reiter M (2011) The expanding Lyme *Borrelia* complex--clinical significance of genomic species? *Clin Microbiol Infect* 17(4): 487–493.
- Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F (2012) Lyme borreliosis. *The Lancet* 379(9814): 461–473.
- Stark K, Niedrig M, Biederbick W, Merkert H, Hacker J (2009) Die Auswirkungen des Klimawandels. Welche neuen Infektionskrankheiten und gesundheitlichen Probleme sind zu erwarten? *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 52(7): 699–714.
- Stoverock M (2006) Verteilungsmuster pathogener Borrelien in ihren natürlichen Vektoren *Ixodes ricinus* in Norddeutschland: Nachweisverfahren auf PCR-Basis. <http://dnb.info/979900832/34>. Letzter Zugriff 12.03.2015.
- Strube C, Montenegro VM, Epe C, Eckelt E, Schnieder T (2010) Establishment of a minor groove binder-probe based quantitative real time PCR to detect *Borrelia burgdorferi* sensu lato and differentiation of *Borrelia spielmanii* by *ospA*-specific conventional PCR. *Parasit Vectors* 3:69.
- Strube C, Schicht S, Schnieder T (2011) *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the region of Hannover (Germany). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 124(11-12): 512–517.
- Stunzner D, Hubalek Z, Halouzka J, Postic D, Pierer K, Marth E (1998) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks from Styria (Austria) and species identification by PCR-RFLP analysis. *Zentralbl Bakteriol* 288(4): 471–478
- Stunzner D, Hubalek Z, Halouzka J, Wendelin I, Sixl W, Marth E (2006) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the tick *Ixodes ricinus* in the Styrian mountains of Austria. *Wien Klin Wochenschr* 118(21-22): 682–685.
- Sumilo D, Asokliene L, Bormane A, Vasilenko V, Golovljova I, Randolph SE (2007) Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS One* 2(6): e500.
- Szell Z, Sreter-Lancz Z, Marialigeti K, Sreter T (2006) Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet Parasitol* 141(3-4): 377–379.
- Talleklint L, Jaenson TG (1997) Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in south-central Sweden. *Exp Appl Acarol* 21(12): 755–771.
- Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14(3): 303-8.

- Vanwambeke SO, Sumilo D, Bormane A, Lambin EF, Randolph SE (2010) Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(5): 497–506.
- Waiblinger HU, Graf N, Broll H, Grohmann L, Pietsch K (2011) Evaluation of real-time PCR results at the limit of detection. *J. Verbr. Lebensm.* 6(4): 411–417.
- Wang G, Liveris D, Brei B, Wu H, Falco RC, Fish D, Schwartz I (2003) Real-Time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 69(8): 4561–4565.
- Weber K, Burgdorfer W (eds) (1993) *Aspects of Lyme Borreliosis*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de BA, de VA, Dimmers W, Akkerhuis OG, Schouls LM, Borgsteede F, van dGJ (2006) Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 72(12): 7594–7601.
- Wilhelmsson P, Fryland L, Borjesson S, Nordgren J, Bergstrom S, Ernerudh J, Forsberg P, Lindgren PE (2010) Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. *J Clin Microbiol* 48(11): 4169–4176.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel UC (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49(1): 13–21.
- Wilske B, Steinhuber R, Bergmeister H, Fingerle V, Schierz G, Preac-Mursic V, Vanek E, Lorbeer B (1987) Lyme-Borreliose in Süddeutschland: Epidemiologische Daten zum Auftreten von Erkrankungsfällen sowie zur Durchseuchung von Zecken (*Ixodes ricinus*) mit *Borrelia burgdorferi* *Dtsch med Wochenschr* 1987; 112(45): 1730-1736
- Wolff D, Gerritzen A (2011) Evaluation of a real-time PCR assay for the detection, genotyping, and quantification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes* ticks in a routine laboratory setting. *Clin Lab* 57(1-2): 67–73
- World Health Organization Regional Office for Europe (2006) Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf. Letzter Zugriff 12.03.2015.
- Yang J, Liu Z, Guan G, Che R, Niu Q, Li Y, Liu J, Ma M, Ren Q, Liu A, Luo J, Yin H (2012) Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73(1): 80–83.
- Zakovska A, Netusil J, Martinikova H (2007) Influence of environmental factors on the occurrence of *Ixodes ricinus* ticks in the urban locality of Brno - Pisarky, Czech Republic. *J Vector Ecol* 32(1): 29–33.

Anhang**Anhang 1:** Sammelstellen im Bayerischen Wald; BW=Bayerwald, NPBW=Nationalpark

Standort		Kürzel	Höhe [m ü. NN]	Vegetation
Grieshaus (Niederalteich)	BW	Isa32	318	Auwald, Buchenmischwald
Isarmündung	BW	Isa31	321	Auwald
Jochenstein	BW	Jos22	370	Buchenmischwald
Sulzsteg (Lindau)	BW	Jos17	375	Buchenmischwald
Hinterreckenberg	BW	Igg35/36	407	Buchenmischwald
Elsenthal	BW	Els5	505	Buchenmischwald
Haufnang-Senging	BW	Sal27	540	Buchen/Fichtenmischwald
Erlau	BW	Jos19	590	Buchenmischwald
Schleicher	NPBW	NP37	690	Fichtennadelwald
Waldspielplatz	NPBW	T2-1	740	Buchen-Fichtenmischwald
Falkenstein	NPBW	T4-34	765	Buchen/Fichtenmischwald
Falkenstein	NPBW	T4-35	775	Waldrand
Schwarzachebene	NPBW	T2-23	827	Totholzbereich
Gfäll	NPBW	T2-45	945	Buchenwald
Rachel	NPBW	T2-50	1100	Wegrand
Falkenstein	NPBW	T4-58	1215	Nadelwald
Falkenstein	NPBW	T4-78	1340	Niedrigwüchsige Fichten
Waldschmidthaus	NPBW	T2-63	1360	Wiesen-Strauchschicht

Anhang 2: Mittlere Zeckenaktivität an allen Beprobungspunkten im Jahr 2011

Ort	Höhe [m]	Plots à 100 m ² N	IR N	Zeckenaktivität/100 m ²					
				Mean	95% KI	Median	Min	Max	Spannweite
EG	489	78	498	6,5	[3,6;9,4]	2	0	64	64
OSH	483	128	1365	12,2	[9,9;14,6]	7	1	50	49
LI	420	5	117	23,6	[5,5;41,7]	28	7	41	34
<u>NPBW</u>	690-1360	87	12	0,15	[-0,03;0,12]	0	0	7	0
T2-63	1360	17	0	0					
T4-78	1340	2	0	0					
T4-58	1215	2	0	0					
T2	1100	5	2	0,4	[-0,3;1,1]	0	0	1	1
T2-45	945	17	0	0					
T2-23	827	17	3	0,18	[-0,03;0,38]	0	0	1	1
T4-34	775	3	0	0					
T4	765	4	0	0					
T2-1	740	17	0	0					
NP37	690	3	7	2,3	[-7,7;12,37]	0	0	7	7
<u>BW</u>	318-590	64	2530	39,5	[22,7;56,4]	18,5	0	393	393
Jos19	590	2	65	32,5	[-253;318]	32,5	10	55	45
Sal27	540	15	499	33,3	[12,2;54,4]	16	0	115	115
Els5	505	19	359	18	[8,0;29,7]	9	0	77	77
Igg35/36	407	8	289	36,2	[19,2;53,0]	35	0	69	69
Jos17	375	6	979	163	[-10,4;336]	102	0	393	393
Jos22	370	6	312	52	[23,1;80,9]	52	16	87	71
Isa31	321	4	0	0					
Isa32	318	4	27	6,8	[-1,8;15,3]	6	1	14	13

N=Anzahl; KI= Konfidenzintervall; Min=Minimum; Max=Maximum, IR= *Ixodes ricinus*, Abkürzungen der Beprobungspunkte in Anhang 1

Anhang 3: Mittlere Luftfeuchtigkeit an allen Beprobungspunkten

Ort	Höhe [m]	Plots à 100 m ² N	mittlere Zeckenaktivität	Luftfeuchtigkeit					
				Mean	SD	Median	Min	Max	Spannweite
EG	489	78	6,5	69,9	12,5	71	40,5	89	48,5
OSH	483	128	12,2	63	16,5	67,8	35,3	81,1	45,8
LI	420	5	23,6	52,3	9,1	50	44	65	21
<u>NPBW</u>	740-1360	87	0,15	65,7	14,9	68	40	85	45
T2-63	1360	17	0	64,88	14,9	63,5	56,5	73	16,5
T4-78	1340	2	0	n.d.					
T4-58	1215	2	0	n.d.					
T2	1100	5	0,4	n.d.					
T2-45	945	17	0	68,94	15	66,75	57,5	81	23,5
T2-23	827	17	0,18	64,07	15,1	65,25	40	85	45
T4-34	775	3	0	66	5,5	66	61	71	10
T4	765	4	0	51	6,4	51	45,5	56,5	11
T2-1	740	17	0	70	14,9	70,38	47	84,5	37,5
NP37	690	3	2,3	55,75	13,4	55,75	68	43,5	24,5
<u>BW</u>	318-590	64	39,5	63,8	16	67,5	34,5	89	54,5
Jos19	590	2	32,5	28,75	0,4	28,75	28,5	29	0,5
Sal27	540	15	33,3	70,18	15,1	77,75	44,5	85,5	41
Els5	505	19	18	66,25	15	68,13	40	89	49
Igg35/36	407	8	36,2	39	17,9	39	34,5	44	9,5
Jos17	375	6	163	62,33	15,8	75	33	82,5	49,5
Jos22	370	6	52	49,5	15,8	49,5	40,5	62	21,5
Isa31	321	4	0	48,25	2,5	48,25	46,5	50	3,5
Isa32	318	4	6,8	35	0,7	35	34,5	35,5	1

N=Anzahl; SD=standard deviation; Min=Minimum; Max=Maximum; n.d.=nicht durchgeführt

Anhang 4: Mittlere Temperatur an allen Beprobungspunkten

Ort	Höhe [m]	Plots à 100 m ² N	mittlere Zeckenaktivität	Temperatur					
				Mean	SD	Median	Min	Max	Spannweite
EG	489	78	6,5	18,8	3,5	19	10,5	23,5	13
OSH	483	128	12,2	17,3	3,1	17,3	11,25	21,5	10,25
LI	420	5	23,6	22,4	2,6	22,75	19	25	6
<u>NPBW</u>	740-1360	87	0,15	19,8	3,9	19,5	13	27,5	14,5
T2-63	1360	17	0	18,16	3,84	19,13	13	21,4	8,4
T4-78	1340	2	0	n.d.					
T4-58	1215	2	0	n.d.					
T2	1100	5	0,4	n.d.					
T2-45	945	17	0	19	4,6	18,63	14	24,76	10,76
T2-23	827	17	0,18	23,25	4,3	24,88	17	26,25	9,25
T4-34	775	3	0	25	2,1	25	23,5	26,5	3
T4	765	4	0	28,25	0	28,25	28,25	28,25	0
T2-1	740	17	0	22,25	4,1	23,38	16,5	25,75	9,25
NP37	690	3	2,3	27	0	27	27	27	0
<u>BW</u>	318-590	64	39,5	19,7	3,9	20	12,5	26	13,5
Jos19	590	2	32,5	20,5	0	20,5	20,5	20,5	0
Sal27	540	15	33,3	19,97	3,86	20,19	15,5	24	9,5
Els5	505	19	18	20,3	5,2	22,75	12,5	26	13,5
Igg35/36	407	8	36,2	22,75	2,12	22,75	21,5	24,5	3
Jos17	375	6	163	20,13	3,71	20,13	17,5	22,75	5,25
Jos22	370	6	52	22	4,24	22	19	25	6
Isa31	321	4	0	21,75	0	21,75	21,75	21,75	0
Isa32	318	4	6,8	21,25	0	21,25	21,25	21,25	0

N=Anzahl; SD=standard deviation; Min=Minimum; Max=Maximum; n.d.=nicht durchgeführt

Anhang 5: Übersicht über Verteilung der einzelnen Spezies an allen Beprobungspunkten

Ort	n	Entw	n	pos		pos*		Bb s.s.		B. a.		B. g.		B. b.		B. s.		B. v.		n.i.	
				#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
OSH	1365	N	314	45	14,3%	45	13	28,9%	13	28,9%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	2,2%	18	40,0%	
		A	1051	177	16,8%	188	35	18,6%	36	19,1%	27	14,4%	4	2,1%	7	3,7%	26	13,8%	53	28,2%	
EG	498	N	115	17	14,8%	18	6	35,3%	8	47,1%	0	0,0%	0	0,0%	1	5,6%	0	0,0%	3	16,7%	
		A	383	80	20,9%	88	20	25,0%	28	35,0%	1	1,3%	0	0,0%	6	7,5%	4	5,0%	29	33,0%	
LI	117	N	83	16	19,3%	16	3	18,8%	2	12,5%	1	6,3%	1	6,3%	0	0,0%	1	6,3%	8	50,0%	
		A	34	17	50,0%	18	5	27,8%	5	27,8%	0	0,0%	1	5,6%	0	0,0%	0	0,0%	7	38,9%	
BW	2520	N	2124	171	8,1%	174	46	26,4%	75	43,1%	16	9,2%	8	4,6%	0	0,0%	6	3,4%	24	13,8%	
		A	396	74	18,7%	75	20	26,7%	26	34,7%	10	13,3%	2	2,7%	2	2,7%	8	10,7%	7	9,3%	
Gesamt	4512	N	2644	249	9,4%	254	68	27,3%	98	39,4%	17	6,8%	9	3,6%	1	0,4%	8	3,2%	53	20,9%	
		A	1868	348	18,6%	369	80	23,0%	95	27,3%	38	10,9%	7	2,0%	15	4,1%	38	10,9%	96	26,0%	
		Gesamt	4512	597	13,2%	623	148	23,8%	193	31,0%	55	8,8%	16	2,6%	16	2,6%	46	7,4%	149	23,9%	

Entw=Entwicklungsstadium; N=Nymphen; A=Adulte; n=Anzahl; pos=Anzahl der borrelieninfizierten Zecken; pos*=Anzahl der in den infizierten Zecken gefundenen Spezies einschließlich Mehrfachinfektionen; n.i.=nicht identifiziert; Bb s.s.= *B. burgdorferi* s.s.; B.a.= *B. afzelii*; B.g.= *B. garinii*; B.b.=*B. bavariensis*; B.s.=*B. spielmanii*; B.v.=*B. valaisiana*

Anhang 6: Übersicht über Verteilung der einzelnen Spezies an den einzelnen Beprobungspunkten im BW

Ort	n	Entw	n	pos		pos*	Bb s.s.		B. a.		B. g.		B. b.		B. s.		B. v.		n.i.	
				#	%		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Els5	358	N	288	10	3,5%	10	3	30,0%	5	50,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	20,0%
		A	70	12	17,1%	13	3	23,1%	3	23,1%	2	15,4%	0	0,0%	2	15,4%	2	16,7%	1	7,7%
Sal27	499	N	388	26	6,7%	26	3	11,5%	15	57,7%	2	7,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	6	23,1%
		A	111	10	9,0%	10	3	30,0%	3	30,0%	2	20,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	10,0%	1	10,0%
Igg35/36	289	N	236	21	8,9%	21	2	9,5%	14	66,7%	1	4,8%	2	9,5%	0	0,0%	0	0,0%	2	9,5%
		A	53	12	22,6%	12	0	0,0%	9	75,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	16,7%	1	8,3%
Jos17	976	N	875	73	8,3%	76	28	36,8%	22	28,9%	6	7,9%	6	7,9%	0	0,0%	4	5,3%	10	13,2%
		A	101	23	22,8%	23	6	26,1%	7	30,4%	3	13,0%	1	4,3%	0	0,0%	3	13,0%	3	13,0%
Jos19	65	N	64	9	14,1%	9	2	22,2%	3	33,3%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	11,1%	3	33,3%
		A	1	0	0,0%	0														
Jos22	306	N	258	28	10,9%	28	6	21,4%	13	46,4%	7	25,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	3,6%	1	3,6%
		A	48	15	31,3%	15	7	46,7%	4	26,7%	3	20,0%	1	6,7%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Isa31	0	N	0																	
		A	0																	
Isa32	27	N	15	5	33,3%	5	2	40,0%	3	60,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
		A	12	2	16,7%	2	1	50,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%
Gesamt	2520	N	2124	171	8,1%	174	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
		A	396	74	18,7%	75	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	2,7%	0	0,0%	0	0,0%

Abkürzungen s. Anhang 5

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Sing für die freundliche Aufnahme am LGL, die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit dort meine Arbeit anzufertigen. Für seine konstruktive Kritik bin ich sehr dankbar.

Ein großer Dank gilt Dr. Volker Fingerle für seine umfassende Betreuung. Er war immer zu erreichen und konnte mir in Diskussionen neue Perspektiven auf die Arbeit vermitteln. Ebenso möchte ich Dr. Christiane Klier erwähnen, die immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Cecilia Hizo-Teufel und Wiltrud Strehle für die großartigen Hilfestellungen und natürlich auch den ein oder anderen Plausch zwischendurch.

Thomas Prassler für die Unterstützung bei der Daten-Auswertung und die schnelle Hilfe, wenn es Probleme mit der Datenbank gab.

Florian Luber und Anne Hosken danke ich für die freundliche Atmosphäre im Labor. Sie haben meinen Horizont um die Lebensmitteltechnologie erweitert, indem sie mich immer an ihren Ergebnissen teilhaben ließen.

Mein allergrößter Dank gebührt Karola Grünwald, Marzena Maggipinto und v.a. Daniela Sebah. Ohne ihre Hilfestellung wäre ich im Labor ziemlich schnell hoffnungslos verloren gewesen, aber ihre Geduld und ihre Hilfestellungen haben mich letztendlich zu einem selbstständigen Doktoranden werden lassen.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Präsentationen

Klier C, Brenauer J, Baum U, Hizo-Teufel C, Liebl B, Prassler T, Sebah D, Sing A, **Teußer LM**, Wildner M and Fingerle V (2011) *Climate change in bavaria- what's the effect on borrelia and ticks?* Medical Biodefense Conference 2011, Munich, 25.10.-28.10.2011, MP196

Teußer LM, Klier C, Brenauer J, Baum U, Huber I, Prassler T, Sebah D, Sing A and Fingerle V (2012) *Is there an effect of climate on ticks and borrelia?* Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, 14.3. – 17.3. 2012, Heidelberg. P51

Klier C, Brenauer J, **Teußer M**, Sing A and Fingerle V (2012) *Biotic and abiotic factors influencing Ixodes ricinus activity.* 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Hamburg, 30.9. – 3.10.2012. RKV06

Klier C, Brenauer J, **Teußer M**, Sing A and Fingerle V, 2012. *Surveillance of Ixodes ricinus and prevalence of Borrelia burgdorferi s.l. in Bavaria.* ESCAIDE, Edinburgh, 24.10.-26.10.2012. ESCAIDE Reference Number: 20121052

Brenauer J, **Teusser M**, Hizo-Teufel C, Sing A, Fingerle V, 2013. *Analytical sensitivity of different PCR amplification protocols for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato.* 13th International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, Boston, 18.8.-21.8.2013

Silaghi C, Baessler C, Baum U, Beierkuhnlein C, Bleichert P, Bogdan C, Bozem P, Brenauer J, Fingerle V, Fischer D, Häberlein S, Hautmann W, Klier C, Liebl B, Lüpke M, Müller J, Osterberg A, Pfister K, Poljak S, Praßler T, Rinder H, Schex S, Sing A, **Teußer L**, Thoma B, Thomas S, Wildner M und Essbauer S: *Durch Vektoren übertragene Zoonoseerreger in Zeiten des Klimawandels - Der bayerische Forschungsverbund VICCI stellt sich vor.* Deutsches Tierärzteblatt 3/12, 350-359.

Eidesstattliche Versicherung

Teußer, Lars-Malte

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur Prävalenz und Dynamik von *Ixodes ricinus* und deren Infektionsrate mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Bayern sowie zur Diagnostik von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mittels real-time PCR

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.
