Aus dem Nationalen Referenzzentrum für Borrelien am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Oberschleißheim.

Präsident: Dr. med. Andreas Zapf

Entwicklung und Validierung einer neuen *p41* Duplex Real-Time PCR zum simultanen Nachweis und zur Differenzierung von *Borrelia miyamotoi* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato

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

vorgelegt von
Rita Venczel

aus
Gräfelfing

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. phil. Andreas Sing
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister PD Dr. med. Wolfgang Fischer
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Gabriele Margos; Dr. med. Volker Fingerle
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis 5
Tabellenverzeichnis 6
I. Einleitung 9
I.1. Beschreibung der Spirochäten 9
I.2. Vektoren des *B.burgdorferi* s.l. Spezieskomplexes 12
I.3. Lyme-Borreliose 14
I.3.a Erreger der Lyme-Borreliose 14
I.3.b Beschreibung der Lyme-Borreliose 15
I.4. Rückfallfieber 18
I.4.a Erreger des Rückfallfiebers 18
I.4.b Beschreibung des Rückfallfiebers 19
I.5. *Borrelia miyamotoi* 21
I.5.a Entdeckung einer neuen Spezies 21
I.5.b Vorkommen der *B. miyamotoi* 21
I.6. Medizinische Bedeutung von *B. miyamotoi* 24
I.6.a Klinische Symptome bei *B. miyamotoi*-Infektionen 24
I.6.b Übertragung von *B. miyamotoi* 25
I.6.c Kultivierung von *B. miyamotoi* 26
I.7. Medizinische Bedeutung 27
I.7.a Durch Zecken übertragene Erkrankungen 27
I.7.b Diagnostik und Prinzip der Polymerasekettenreaktion 28
I.7.c Therapie und Prävention 32
II. Fragestellung und Hinführung zum Thema 33
III. Material und Methoden 34
III.1. Herkunft der Zecken-DNA 34
III.1.a Beprobungsdetails 34
III.1.b Beprobungsort Siebengebirge 35
III.1.c Beprobungsorte Englischer Garten (München), Grafrath und Oberschleißheim 37
III.1.d Extraktion der Zecken-DNA 38
III.2. *p41* Real-Time Polymerasekettenreaktion 39
III.2.a *p41 B. burgdorferi* s.l. Simplex Real-Time PCR 39
III.2.b *p41 B. miyamotoi* Simplex Real-Time PCR 40
III.2.c *p41 B. miyamotoi* und *p41 B. burgdorferi* s.l. Duplex Real-Time PCR 41
III.3. Weiterführende Diagnostik 44
III.3.a *glpQ* PCR 44
III.3.b MLST 45
III.3.c Gelelektrophorese und Sequenzierung 47
III.4. *hbb*-Schmelzkurvenanalyse 48
III.5. Versuch zur Screeningmethode im humanmedizinischen Bereich 50
III.5.a Kultivierung von *B. miyamotoi* 50
III.5.b Herstellung gespikter Patientenproben 51
III.6. Material 52
IV. Ergebnisse 53
IV.1. Sondentestung 53
IV.1.a Spezifität der *p41*-Sonden 53
IV.1.b *p41 B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. Simplex & Duplex Real-Time PCR 53

IV.2. Sensitivitätstest 54
IV.2.a Verdünnungsreihe zur Testung der *p41*Duplex Real-Time PCR 54
IV.2.b Verdünnungsreihe der *p41*Duplex Real-Time PCR mit Zecken-DNA 56
IV.2.c *B. miyamotoi* Screening von 50 Zeckenproben aus dem Siebengebirge 2013 mittels *p41* Simplex Real-Time PCR 57
IV.3. Zeckenscreening 59
IV.3.a Zecken aus dem Siebengebirge 2012 60
IV.3.b Zecken aus dem Siebengebirge 2013 61
IV.3.c Zecken aus dem Siebengebirge 2014 62
IV.3.d Zecken aus dem Englischen Garten 2011 62
IV.3.e Zecken aus dem Englischen Garten, Grafrath und Oberschleißheim 2012 63
IV.4. PCR Sensitivitätstest von *glpQ, recG* und *clpA* 65
IV.5. *hbb*-Schmelzkurvenanalyse 66
IV.5.a Schmelzkurvenanalyse der Koinfektionen aus dem Englischen Garten 2010/2012 66
IV.5.b *hbb*-Schmelzkurvenanalyse der drei *B. miyamotoi* Stämme 68
IV.6. *p41* Real-Time PCR an Patientenproben 69
V. Diskussion 71
V.1. Entwicklung und Validierung der *p41* Duplex Real-Time PCR 71
V.2. *B. miyamotoi* als neuer Forschungsfokus 74
V.3. Validierung der *p41* Duplex Real-Time PCR anhand einer Feldstudie 75
V.4. *p41* Duplex PCR als potentielles Instrument für Patientenscreening 77
VI. Zusammenfassung 78
VII. Literaturverzeichnis 79
VIII. Appendix 92
IX. Danksagung 127
X. Veröffentlichungen 129
XII. Eidesstattliche Erklärung 130

Abbildungsverzeichnis

Abbildung I.1.1: Struktur und Morphologie von *Borrelia burgdorferi*.....10
Abbildung I.1.2: Morphologie von *Ixodes ricinus*.....11
Abbildung I.2.1: Geographische Verbreitung von *B. burgdorferi* s.l. Vektoren.....12
Abbildung I.3.1: Geographische Verteilung unterschiedlicher Borrelien Spezies weltweit.....15
Abbildung III.1.1: Darstellung der "flagging"-Methode.....35
Abbildung III.1.2: Geographische Zuordnung des Naturschutzgebietes Siebengebirge.36
Abbildung III.1.3: Darstellung der drei Fanggebiete Grafrath, Oberschleißheim und Englischer Garten.....38
Abbildung IV.2.1: Darstellung der Ct-Werte einer gegenläufigen Verdünnungsreihe mit *B. miyamotoi* und einem *B. afzelii* Stamm (PKo) zur Sensitivitätstestung der *p41* Duplex Real-Time PCR.....55
Abbildung IV.2.16: Agarosebild der *glpQ* PCR von den drei *B. miyamotoi* positiven Proben.....58
Abbildung IV.3.1: Amplifikationskurven der Zecken-Proben aus dem Siebengebirge von August 2013 im Stratagene MXPro30005.....59
Abbildung IV.3.10: Agarosebild von den Produkten der *p41* Simplex Real-Time PCR.....117
Abbildung IV.5.2: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-85" (links) und "EG-245" (rechts).....67
Abbildung IV.5.3: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-309" (links) und den vier Proben "EG-1235", "EG-274", "EG-275" und "EG.272" (rechts).....120
Abbildung IV.5.4: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-296" (links) und "EG-285" (rechts).....120
Abbildung IV.5.5: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-23", "EG-66", "EG-29" (links) und "EG-105" (rechts).....121
Abbildung IV.5.7: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse mit den drei *B. miyamotoi* Stämmen aus Europa, Japan und USA.....68
Abbildung IV.6.2: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit EDTA-Vollblut....70
Abbildung IV.6.4: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit PBS Puffer.....123
Abbildung IV.6.6: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Blutserum.....124
Abbildung IV.6.8: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Kniegelenkspunktat.....125
Abbildung IV.6.10: Darfstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Liquor.....126

Tabellenverzeichnis

Tabelle III.1.1: Anzahl der Zecken aus dem Siebengebirge von 2012 - 2014.....92
Tabelle III.1.2: Anzahl der Zecken aus dem Englischen Garten von 2010 - 2012, Grafrath 2012 und Oberschleißheim 2012.....93
Tabelle III.1.3: Beprobungsdetails der Untersuchungsflächen Englischer Garten (München), Oberschleißheim, Grafrath und Siebengebirge.....93
Tabelle III.2.1: Thermalprofil der *p41 B. burgdorferi* s.l. Simplex Real-Time PCR.....93
Tabelle III.2.2: Borrelien-Stämme aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex mit Konzentration zur Sensitivitätstestung der "Sonden 1, 2 und 3".....41
Tabelle III.2.3: Borrelien-Stämme aus der Familie der Rückfallfieber-Spezies mit Konzentration zur Sensitivitätstestung der "Sonden 1, 2 und 3".....41
Tabelle III.2.4: 11 angezüchtete *B. burgdorferi* s.l. Stämme mit Ausgangskonzentration und Keimzahl, die mit *B. miyamotoi* DNA in einer Verdünnungsreihe..42 zum Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR verwendet wurden.
Tabelle III.2.5: Schematische Darstellung der Verdünnungsreihe mit gegenläufigen Genomäquivalenzen zum Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR.....43
Tabelle III.3.1: Thermalprofil der *glpQ* PCR.....94
Tabelle III.3.2: Zur weiterführenden Diagnostik verwendete MLST-Primer für die *B. miyamotoi housekeeping*-Gene *recG* und *clpA*.....45
Tabelle III.3.3: MLST-Primer der 8 *housekeeping*-Gene von *B. miyamotoi*.....95
Tabelle III.3.4: Thermalprofil der *recG* PCR TD 60-52°C.....95
Tabelle III.3.5: Thermalprofil der *clpA* PCR TD 55-48°C.....96
Tabelle III.4.1: In der *hbb* Schmelzkurvenanalyse verwendete acht angezüchtete Kontroll-Stämme aus dem NRZ-Borrelien Labor.....49
Tabelle III.4.2: Thermalprofil der *hbb* Schmelzkurvenanalyse.....96
Tabelle III.4.3: Orientierende Schmelzpunkte von 8 angezüchteten Stämmen aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex in der *hbb* Schmelzkurvenanalyse.....97
Tabelle III.5.1: Verdünnungsreihe der künstlichen Patientenproben aus EDTA-Vollblut, Serum, Kniegelenkspunktat, Liquor und der Positivprobe mit PBS-Puffer, vermischt mit *B. miyamotoi*.....98
Tabelle IV.1.1: Vergleich und Spezifitätstest der "Sonden 1, 2 und 3" mit 6 Stämmen aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex, 6 Stämmen aus dem Rückfallfieberkomplex und den drei *B. miyamotoi* Stämmen aus Japan, USA und Europain der *p41* Simplex und Duplex Real-Time PCR.....99
Tabelle IV.1.2: Spezifitätstest der beiden Sonden "Sonde2" und "FlaProbe1" in der *p41* Simplex Real-Time PCR.....100
Tabelle IV.2.2:Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{-1} und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{4}.....100
Tabelle IV.2.3: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{0} und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{3}.....101
Tabelle IV.2.4: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{1} und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{2}.....101

Tabelle IV.2.5: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und elf Lyme-Borrelienstämme mit der Genomäquivalenz 10^2.....56
Tabelle IV.2.6: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^1.....102
Tabelle IV.2.7: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^3 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^0.....103
Tabelle IV.2.8: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^4 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{-1}.....103
Tabelle IV.2.9: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{-1} und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^4 gemischt mit Zecken-DNA.....103
Tabelle IV.2.10: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^0 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^3 gemischt mit Zecken-DNA.....104
Tabelle IV.2.11: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^1 und vier Lyme-Borrelien mit der Genomäquivalenz 10^2 gemischt miz Zecken-DNA.....104
Tabelle IV.2.12: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und vier Lyme-Borrelienstämme mit der Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit Zecken-DNA.....57
Tabelle IV.2.13: Sensitivitätstest der *p41* Duplex-Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^1 gemischt mit Zecken-DNA.....104
Tabelle IV.2.14: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^3 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^0 gemischt mit Zecken-DNA.....105
Tabelle IV.2.15: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^4 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{-1} gemischt mit Zecken-DNA.....105
Tabelle IV.3.2: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2012 gegliedert nach den Untersuchungsflächen.....106
Tabelle IV.3.3: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus dem Siebengebirge 2012 mittels *recG* MLST bzw. *glpQ* PCR.....107
Tabelle IV.3.4: genaue Klassifizierung der *B. burgdorferi* s.l. Spezies aus dem Siebengebirge 2013 mittels *hbb* PCR und MLST.....113
Tabelle IV.3.5: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2013 gegliedert nach den Untersuchungsflächen.....108
Tabelle IV.3.6: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus dem Siebengebirge 2013 mittels *recG* MLST bzw. *glpQ* PCR.....110
Tabelle IV.3.7: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2014 gegliedert nach den Untersuchungsflächen.....114
Tabelle IV.3.8: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus dem Siebengebirge 2014 mittels *recG* MLST.....114
Tabelle IV.3.9: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Englischen Garten 2011..114
Tabelle IV.3.11: Nachweis der *B. miyamotoi* aus dem Englischen Garten 2011 mittels *recG* MLST bzw. *glpQ* und *p41* PCR.....116

Tabelle IV.3.12: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Engl. Garten 2012.....117
Tabelle IV.3.13: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus dem Englischen Garten 2012 mittels *recG* bzw. *clpA* MLST, *glpQ* und *p41* PCR.....118
Tabelle IV.3.14: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus Grafrath 2012.....118
Tabelle IV.3.15: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus Grafrath 2012 mittels *recG* und *glpQ* PCR.....119
Tabelle IV.3.16: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus Oberschleißheim 2012.....119
Tabelle IV.3.17: Zusammenfassende Darstellung der Anzahl und der Prävalenzen von *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* aus dem Siebengebirge 2012, 2013 und 2014, Englischen Garten 2011, 2012, Grafrath 2012 und Oberschleißheim 2012.....64
Tabelle IV.5.1: In der *hbb* Schmelzkurvenanalyse verwendete acht angezüchtete Kontrollstämme aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex aus dem NRZ Borrelien Labor.....66
Tabelle IV.5.6: Zuordnung aller Schmelztemperaturen und Stämme der Zecken-Proben aus dem Englischen Garten 2012 und 2010 mittels *hbb* Schmelzkurvenanalyse.....122
Tabelle IV.6.1: *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.....70
Tabelle IV.6.3: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell Verdünnungsreihe mit PBS Puffer.....122
Tabelle IV.6.5: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell Verdünnungsreihe mit Blutserum.....123
Tabelle IV.6.7: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell Verdünnungsreihe mit Kniegelenkspunktat.....124
Tabelle IV.6.9: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell Verdünnungsreihe mit Liquor.....125

I. Einleitung

I.1. Beschreibung der Spirochäten

Zur Familie der Spirochaetacae zählen drei wichtige Krankheitserreger: Die Treponemata, Leptospiren und die Borrelien (Bergström, Garon, Barbour, & MacDougall, 1992). Trotz zahlreicher, unter anderem anatomischer Gemeinsamkeiten stellt sich die Pathogenese dieser Erreger unterschiedlich dar.

Borrelien sind flexible und bewegliche Spiralbakterien mit lockeren irregulären Windungen und lichtmikroskopischer Darstellbarkeit nach Anfärbung mit Anilinfarben. Die meisten Borrelien-Spezies können in serumhaltigem flüssigen Kulturmedium gezüchtet werden und haben eine äußerst lange Verdopplungsdauer von mehreren Stunden, sodass die Kulturen frühestens nach einer Woche bemerkbar wachsen (Hahn, 2009). Phylogenetisch präsentieren Spirochäten einen einzigartigen Baktierienstamm, der sich von allen anderen Bakteriengruppen unterscheidet. Während die meisten Bakterien zirkuläre DNA besitzen, haben Borrelien ein lineares, ca. 1-Mb großes Hauptchromosomen, das durch mehrere lineare und zirkuläre Plasmide oder Minichromosomen ergänzt wird (Bergström et al., 1992; Casjens & Huang, 1993; Davidson, MacDougall, & Saint Girons, 1992). Spirochäten weisen auch morphologische Besonderheiten auf. Eine innere und eine äußere Membran umhüllen 7-11 periplasmatische Flagellen und eine flexible Zellwand (Abbildung I.1.1). Die äußere Membran ist leicht zerstörbar und beinhaltet keine Lipopolysaccharide (LPS) (Coleman, Benach, Beck, & Habicht, 1986; Fraser et al., 1997; Takayama, Rothenberg, & Barbour, 1987). Borrelien besitzen ein segmentiertes Genom, das z.B. bei *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31 aus einem kleinen linearen, ca. 900-920 kbp großen Hauptchromosom und12 linearen und 9 zirkulärenPlasmiden (Casjens et al., 2000) mit 9-56 kbp (Fraser et al., 1997) besteht. Die Länge der Borrelien variiert je nach Genospezies zwischen 8 und 30 µm und die Breite zwischen 0,2 und 0,5 µm (Barbour & Hayes, 1986). Spirochäten benötigen für die charakteristische, spiralförmige Bewegung eine Proteinstruktur, das Endoflagellum. Es besteht aus einem Flagellin-Protein mit einer molekularen Masse von 38 kDa in Rückfallfieber-Borrelien und 41 kDa in Lyme-Borrelien. Das 1 kb große *fla*-Gen kodiert für das Flagellin-Protein (Fukunaga, Okada, Nakao, Konishi,& Sato, 1996; Fukunaga et al., 1995; Wallich et al., 1990). Die Flagella sind an den beiden Enden des protoplasmatischen Zylinders befestigt und befinden sich zwischen diesem und der äußeren Membran (Holt, 1978).

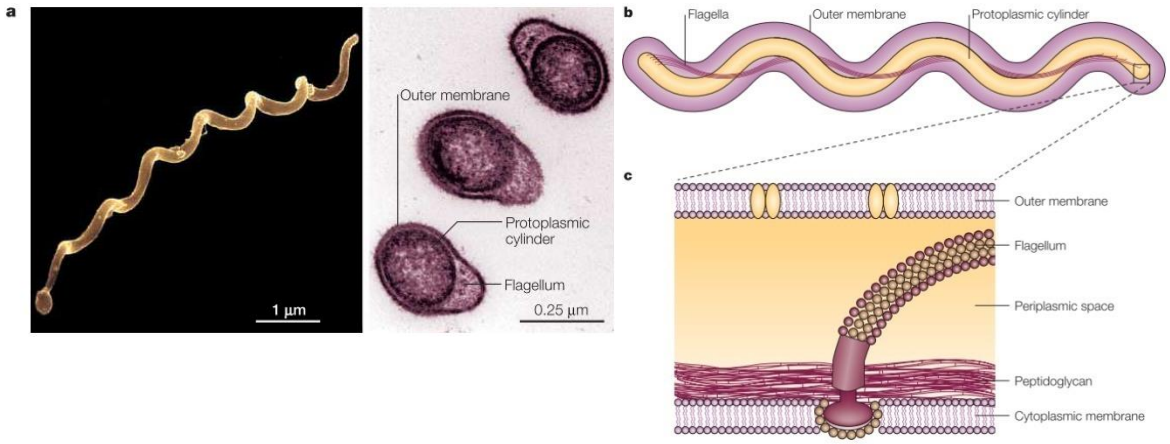


Abbildung I.1.1: Struktur und Morphologie von *Borrelia burgdorferi*a) Links ist die spiralförmige Struktur in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme zu sehen. In der rechten Abbildung ist eine *transmissionselektromikroskopische Aufnahme* von *B. burgdorferi* im Querschnitt erkennbar. b) Schematische Darstellung der Geißel einer Spirochäte. Die Flagellen der Borrelie sind um den zentralen, flexiblen und stabförmigen Protoplasmazylinder gewickelt. Um dieses Gerüst legt sich die äußere Membran und trennt es vom periplasmatischen Raum. c) Detaillierte Darstellung einer Flagelle (Rosa, Tilly, & Stewart, 2005).

In den 1980-er Jahren wurden Borrelien das erste Mal mit dem Krankheitsbild der Lyme-Arthritis in Verbindung gebracht (Burgdorfer et al., 1982). Heute bildet die Gruppe der Lyme-Borreliose-Spirochaeten einen bakteriellen Spezieskomplex, den *B. burgdorferi* sensu lato Spezieskomplex, der ungefähr 20 Genospezies umfasst. Beispiele für humanpathogene Genospezies aus diesem Erregerkomplex sind *B. burgdorferi* sensu stricto (Fraser et al., 1997; Johnson, Schmid, Hyde, Steigerwalt, & Brenner, 1984), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. bavariensis* (Margos et al., 2013), *B. afzelii* (Canica et al., 1993) und *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), außerdem die Erreger des Rückfallfiebers, wie *B. recurrentis (Baltazard, 1954)* und *B. hermsii* (Spiller, 1986). Diese Spirochäten werden hauptsächlich von Zecken als Vektoren zwischen Vertebratenwirten übertragen (Hahn, 2009).

Abbildung I.1.2: Morphologie von *Ixodes ricinus*.(Oben links ist eine Larve erkennbar, daneben rechts die Nymphe, unten links ein nüchternes Weibchen und unten rechts das Männchen) (Satz, 2002)

Die Gattung der Borrelien beinhaltet zahlreiche Spezies, die sich grob in drei Gruppen aufteilen lassen: Zur einen Gruppe gehören die Erreger der Lyme-Borreliose, die durch Schildzecken, vor allem der Gattung *Ixodes* übertragen werden.Vier Spezies dieser Gattung, die bei der Übertragung von Borrelien auf den Menschen eine Rolle spielen, sind I. *scapularis* und I. *pacificus* in Nordamerika, I. *ricinus* in Europa, Westasien und Nordafrika und I. *persulcatus* in Asien und Osteuropa (Anderson, 1990; Eisen & Lane, 2002; Hue, Langeroudi, & Barbour, 2013).

Zur zweiten Gruppe zählen alle Erreger des Rückfallfiebers. Diese werden hauptsächlich durch Lederzecken und Läuse verbreitet (Barbour & Hayes, 1986). Schildzecken sind mit Lederzecken entfernt verwandt (Black & Piesman, 1994).

Zu der zweiten Gruppe zählen aber auchBorrelien-Spezies, die ausschließlich von Schildzecken übertragen werden, *B. theileri*, *B. lonestari*, und *B. miyamotoi* (Fukunaga et al., 1995; Hue et al., 2013; Rich, Armstrong, Smith, & Telford, 2001; Scoles, Papero, Beati, & Fish, 2001). Einige Quellen berichten auch von einer dritten, Reptilien-assoziierten Borrelien-Gruppe (Franke, Hildebrandt, & Dorn, 2013; Takano et al., 2010).

I.2. Vektoren des *B. burgdorferi* s.l. Spezieskomplexes

Schildzecken sind weltweit die wichtigsten Vektoren für zahlreiche Krankheitserreger. Infizierte Zecken werden durch ihre wild lebenden Wirte, vor allem durch Vögel, den wichtigsten Wirten von *B. garinii* und *B. valaisiana*, und durch kleine Nagetiere oder Eichhörnchen, den Hauptwirten von *B. anserina* und *B. burgdorferi* s.s. (Kurtenbach et al., 1998; Kurtenbach et al., 2002), weiter verbreitet, sodass Borrelien auch in neue Gebiete gelangen können (Rollend, Fish, & Childs, 2013). Studien zufolge führt möglicherweise der Klimawandel zu einer Ausbreitung der genannten Vektoren in Richtung Norden. So verlagerte sich beispielsweise in den letzten 20 Jahren der Lebensraum der I. *ricinus* von 61°N weiter nördlich nach 66°N. Auch die Höhenlage änderte sich vergleichbar, zum Beispiel in Tschechien von 700 m bis 1100 m über der Meereshöhe (Gray, Dautel, Estrada-Peña, Kahl, & Lindgren, 2009; Lindgren, Tälleklint, & Polfeldt, 2000).

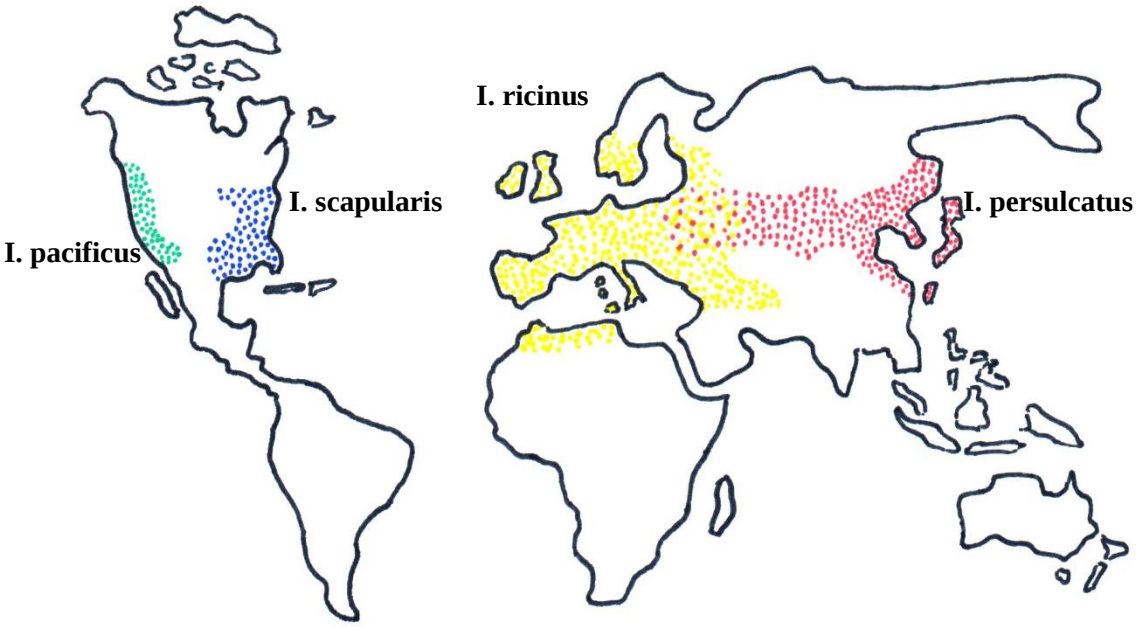


Abbildung I.2.1: GeographischeVerbreitung von *B.burgdorferi* s.l. Vektoren.

Zecken reagieren äußerst empfindlich auf klimatische Änderungen oder die Umgebung, da sie in der nichtparasitären Phase eine konstante mikroklimatische Feuchtigkeit von 80% benötigen, um nicht auszutrocknen. Speziell in Europa ist die Spezies *I. ricinus* überall vorzufindenund ist hier der wichtigste Vertreter der Gattung Ixodes (Gray,

1991). Sie ist auch die häufigste Zeckenspezies in Deutschland, die mittels der "flagging-Methode" gesammelt werden kann (Matuschka, Lange, Spielman, Richter, & Fischer, 1990). Sie ist für bis zu 95% aller durch Zecken übertragener Erkrankungen verantwortlich (Süss, Fingerle, Hunfeld, Schrader, & Wilske, 2004). Am häufigsten sind diese Arthropoden in geeigneter Vegetation, wie in Laubstreuschichten und in lichten Nadel- oder Mischwäldern vorzufinden (Lindström & Jaenson, 2003). Sie leben in Streuschichten oder tieferen Vegetationsschichten mit einer für ihr Überleben geeigneten Luftfeuchtigkeit. Zur Wirtssuche begeben sie sich auf Gräser und andere niedrige Vegetation. Sobald sich die Zecke an einen Wirt gehängt hat, sucht sie sich eine geeignete Stelle am Körper aus, wo sie mit dem Saugakt beginnt. Mit dem Speichel gibt die Zecke ein lokalanästhetisch wirksamesSekret ab, sodass ein Zeckenstich nur in ca. 50% der Fälle frühzeitig entdeckt wird. Die Borrelien wandern nun aus dem Mitteldarm der Arthropoden in die Speicheldrüsen und werden so über den Speichel übertragen. Das Infektionsrisiko nimmt nach einer eintägigen Saugdauer zu, sodass die Zecke möglichst schnell entfernt werden sollte. Dennoch entwickelt nur ca. 1% der Gestochenen das Krankheitsbild der Borreliose (Hahn, 2009).

In Europa ist *I. ricinus* von Südskandinavien bis zum Mittelmeer vorzufinden und kommt ebenfalls in einigen Regionen Asiens, wie dem Uralgebirge vor (Perez & Rodhain, 1977). In mediterranen Gebieten ist sie aufgrund des warmen und trockenen Klimas jedoch nur in höher gelegenen Regionen vorzufinden (Estrada-PeñA, 2001; Subramanian, Sekeyova, Raoult, & Mediannikov, 2012). Gewöhnlich haben Ixodes-Zecken eine Lebenserwartung von zwei Jahren und durchleben drei Entwicklungsstadien: Larve, Nymphe und das ausgewachsene, geschlechtsreife Stadium (Masuzawa, 2004). Jedes dieser Stadien nimmt eine Blutmahlzeit an einem Wirt auf und begünstigt eine Übertragung der Krankheitserreger.

Wie in Abbildung I.2.1 zu sehen ist, sind die wichtigsten Vertreter der Ixodes-Zecken auf der nördlichen Hemisphäre vorzufinden. Außerdem sind *I. pacificus* und *I. scapularis* in Nordamerika und I. *persulcatus* in Asien verbreitet.

I.3. Lyme-Borreliose

I.3.a Erreger der Lyme-Borreliose

In den letzten Jahrzehnten nahm die Infektionsrate aufgrund der zunehmenden Häufigkeit von Ixodes-Zecken in Europa zu (Daniel, Danielová, Kříž, & Kott, 2004; Jouda, Perret, & Gern, 2004; Kampen, Rötzel, Kurtenbach, Maier, & Seitz, 2004).

Oft zeigen adulte *I. ricinus* Zecken höhere Infektionsraten auf als Nymphen (Kurtenbach et al., 1995), so beispielsweise in Schweden mit 33% in adulten Zecken und 14% in Nymphen. Der Grund hierfür ist, dass bis zum Adultstadium Zecken öfter die Gelegenheit hatten als Larven und Nymphen an Wirten zu saugen, die möglicherweise mit Borrelien infiziert waren. Unter den identifizierten Spezies in Schweden erwies sich *B. afzelii* mit 61% und *B. garinii* mit 23% als die dominanten Genospezies, während *B. miyamotoi* nur 1% betrug. 3% dieser Zecken waren mit verschiedenen *B. afzelii* Serotypen koinfiziert. In anderen Gebieten wurde eine Koinfektionsrate von bis zu 64% gefunden (Bunikis et al., 2004; Fraenkel, Garpmo, & Berglund, 2002; Gustafson, Jaenson, Gardulf, Mejlon, & Svenungsson, 1995; Wilhelmsson et al., 2010).

Die Infektionsrate in Zentraleuropa, z.B. im Rheinland, Deutschland, betrug im Durchschnitt 3,5% (Richter, Schlee, & Matuschka, 2003) und in der Slowakei 25%, wobei 19 der getesteten Zecken mit Lyme-Borrelien und nur eine Zecke mit *B. miyamotoi* infiziert war (Subramanian et al., 2012).

In Polen wurde eine Infektionsrate von bis zu 58,3% mit *B. burgdorfei* s.l. gefunden. Auch hier waren adulte Zecken häufiger betroffen als Nymphen oder Larven (Kiewra, Stańczak, & Richter, 2014; Stańczak, Kubica-Biernat, Racewicz, Kruminis-Łozowska, & Kur, 2000). Die Verbreitung der verschiedenen Genotypen ist ortsabhängig. Die höchsten Infektionsraten kommen in Zentraleuropa vor. Die häufigsten Spezies in Europa sind *B. afzelii* und *B. garinii* (Rauter &Hartung, 2005; Reye, Hübschen, Sausy, & Muller, 2010). Diese Spezies sind bekannte Krankheitserreger, während die Pathogenität anderer Spezies, wie *B. lusitaniae* (Le Fleche, Postic, Girardet, Peter, & Baranton, 1997), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997) und *B. bissettiae* trotz weniger dokumentierter Krankheitsfälle ungewiss ist (Gern, Douet, López, Rais, & Cadenas, 2010; G. Margos et al., 2016; Rizzoli et al., 2011; Wang, Van Dam, Schwartz, & Dankert, 1999). Der Erreger-Komplex der Lyme-Borreliose ist sehr vielfältig. Seit 1982 wurden sechzehn verschiedene Spezies beschrieben, welche sich in ihren

phänotypischen und genetischen Eigenschaften unterscheiden. *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii* sind für die meisten Lyme-Borreliose-Fälle weltweit verantwortlich (Lunemann & Krause, 2003; Wodecka, Leonska, & Skotarczak, 2010). Andere Autoren berichten hingegen von 19 bekannten Genospezies aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex (Franke et al., 2013; Margos, Vollmer, Ogden, & Fish, 2011; Rizzoli et al., 2011).

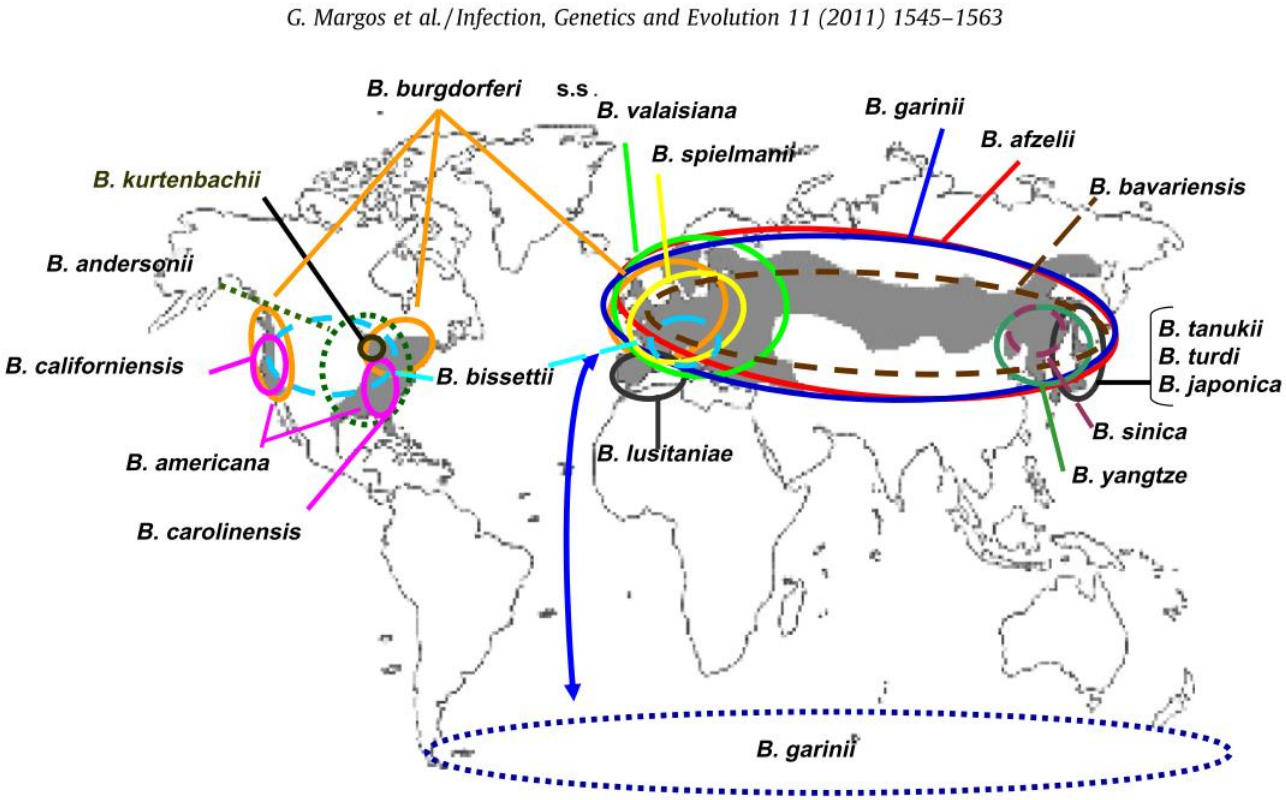


Abbildung I.3.1: Geographische Verteilung unterschiedlicher Borrelien Spezies weltweit (Margos et al., 2011).

I.3.b Beschreibung der Lyme-Borreliose

Die Lyme-Borreliose wurde in den 1970-er Jahren das erste Mal als Lyme-Arthritis in der Stadt Old Lyme, Connecticut, USA beschrieben (Steere et al., 1977) und ist in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre vorzufinden. In Zentraleuropa kommt es jährlich zu 40-300 Krankheitsfällen pro 100.000 Einwohnern (O'Connell, Granström, Gray, & Stanek, 1998). Der Mensch ist besonders im Zeitraum von Ende April bis Ende Septembergefährdet, da Zecken nur bei Temperaturen von >10°C jagen (Hahn, 2009). Seit der Entdeckung der *B. burgdorferi* s.s. in *I. scapularis* und der Lyme-Borreliose

wurden jährlich 20.000-30.000 Krankheitsfälle in den USA dokumentiert (cdc.gov, 2015). Die Epidemiologie der Lyme-Borreliose unterscheidet sich in Amerika und Europa voneinander, da in Europa deutlich mehr Borreliengenospezies vorkommen (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. und andere), während in den USA hauptsächlich *B. burgdorferi* s.s. vertreten ist (Stanek et al., 2011). Die Krankheit ist in drei Stadien geteilt, wobei das dritte Stadium die chronische Erkrankung beschreibt. Auch eine Infektion mit *B. miyamotoi* zeigt einige Symptome dieser Erkrankung. Die FrühmanifestationErythema migrans kommt bei 70-80% der Patienten vor (Steere, Coburn, & Glickstein, 2004) und beginnt gewöhnlich lokal und breitet sich nur wenige Tage bis Wochen konzentrisch um den Infektionsort herum in der Haut aus (Herzer, Fingerle, Pfister, & Krause, 2014). Das Erythema migrans in Europa, welches durch *B.afzelii* verursacht wird, breitet sich langsamer aus und der gerötete Infektionsort weist häufiger eine zentrale Abblassung auf als in Nordamerika. Allgemeinsymptome wie Fieber, Myalgien, Müdigkeit und Kopfschmerzen können ebenfalls auftreten (Stanek et al., 2011). Die Symptome des Stadiums II können auch auftreten, wenn sich das Stadium I nicht ereignet hatte. Das Stadium II beschreibt die disseminierte Infektion, zu der die Neuroborreliose in Form einer lymphozytären Meningoradikulitis als häufigste klinische Manifestation gehört. 2-12 Wochen nach dem Zeckenstich manifestiert sich die Erkrankung mit anhaltenden polyradikulären Schmerzen, die vor allem nachts auftreten. Eine mögliche Differenzialdiagnose wäre ein Bandscheibenvorfall. Später äußert sich das Krankheitsbild in Form von Gefühlsstörungen und Lähmungen. Patienten mit spinaler Meningoradikulitis können im schlimmsten Fall Hirnnervenausfälleund Meningitiszeichen entwickeln (Meningoradikulitis cranialis), wobei die Facialisparese die häufigste Form ist. Außerdem können zusätzlich ophthalmologische Symptome, Hörstörungen oder eine Herzbeteiligung auftreten. Selten kann es im Stadium II auch zu multiplen Erythemen und dem Borrelien-Lymphozytom kommen, einer Hautmanifestation, bei der bevorzugt an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum derbe Knoten mit bläulich-rötlicher Verfärbung entstehen. Dagegen sind Müdigkeit und ein ausgeprägtes Krankheitsgefühl meistens vorhanden. Transplazentare Übertragungen von Borrelien sind überaus selten; eine intrauterine Erkrankung als Folge einer Borrelieninfektion wurde noch nicht nachgewiesen.

Das Spätstadium, Stadium III, kann sich mehrere Monate bis Jahre nach der Erstinfektion ereignen und ist durch einen chronisch-progredienten Krankheitsverlauf von mehr als sechs Monaten gekennzeichnet. Der Bewegungsapparat (Lyme-Arthritis),

die Haut (Acrodermatitis chronica atrophicans) und selten das Nervensystem (progressive Enzephalomyelitis) können von einer chronischen Manifestation betroffen sein (Hahn, 2009; Stanek et al., 2011).

Die Acrodermatitis chronica atrophicans zeigt eine sehr auffällige Symptomatik an der Haut, die sich in Form einer anfänglichen Entzündung äußert, die schließlich in atrophische Veränderungen übergeht, während die progressive Enzephalomyelitis mit fortschreitenden Lähmungserscheinungen einhergeht. Die Lyme-Arthritis äußert sich meistens in Form wiederkehrender Mono- und Oligoarthritiden der großen Gelenke der unteren Extremitäten, wobei sich überwiegend in den Kniegelenken ausgeprägte Gelenkergüsse entwickeln. In Ausnahmefällen entzünden sich auch Schulter- und Ellenbogengelenke sowie kleinere Gelenke. Als mögliche Differentialdiagnose sollte an eine rheumatische Arthritis gedacht werden (Hahn, 2009; Stanek & Strle, 2003; Steere et al., 2004). Während die Neuroborreliose in Europa häufiger vorzufinden ist, tritt die Lyme-Arthritis in Nordamerika öfter auf (Stanek et al., 2011).

B. burgdorferi s.s. wird meist mit Arthritis und Neuroborreliose assoziiert, *B. garinii* und *B. bavariensis* mit Neuroborreliose (Hahn, 2009) und *B. afzelii* mit Acrodermatitis chronica atrophicans (Assous, Postic, Paul, Nevot, & Baranton, 1993; Rijpkema et al., 1997; Rizzoli et al., 2011). Wie bereits beschrieben, zählen *B.garinii* und *B. afzelii* zu den häufigsten und bekanntesten humanpathogenen Spezies in Europa (Baranton et al., 1992; Canica et al., 1993). Im Gegensatz zu den Rückfallfieber-Borrelien verursachen Lyme-Borrelien verschiedene Entzündungsreaktionen z.B. in Gelenken, der Haut, dem Herzen und dem ZNS (Herzer et al., 2014; Koedel, Fingerle, & Pfister, 2015; Logigian, Kaplan, & Steere, 1990; Steere, Berardi, Weeks, Logigian, & Ackermann, 1990). Aus diesem Grund sind diese Borrelien eher im Gewebe und nicht in der Blutbahn des Wirtes, wie die Erreger des Rückfallfiebers, vorzufinden.

I.4. Rückfallfieber

I.4.a Erreger des Rückfallfiebers

Zu den humanpathogenen Rückfallfieber-Borrelien zählen verschiedene Spezies, wie *B. hermsii* (Stoenner, 1974) in der Nearktis und *B. duttonii* (Novy & Knapp, 1906) in afrikanischen Tropengebieten (Barbour, 2004). *B. recurrentis* kommt natürlicherweise nur in der Kleiderlaus *Pediculus humanus* vor. Andere Rückfallfieber-Borrelien werden durch Lederzecken der Gattung *Ornithodorus* verbreitet (Fraenkel et al., 2002). Alle Rückfallfieber-Borrelien können nur in ihren Vektoren, in Reservoirwirten und in infizierten Patienten überleben. Infektionen von wildlebenden Säugetieren klingen meistens asymtomatisch ab (Hahn, 2009). Diese Spirochäten kommen weltweit vor. In Nordamerika verbreitet sind *B. hermsii*, *B. coriaceae* (Johnson et al., 1987), *B. turicatae* (Felsenfeld, Decker, Wohlheiter, & Rafy, 1965) und *B. parkeri* (Davis & Burgdorfer, 1955). *B. crocidurae* (Brahim, Perrier-Gros-Claude, Postic, Baranton, & Jambou, 2005) und *B. duttonii* kommen in Afrika vor und *B. caucasica* (Assous & Wilamowski, 2009), *B. latyschewii* (Assous & Wilamowski, 2009), *B. microti*(Assous & Wilamowski, 2009) und *B. persica* (Davis & Hoogstraal, 1956) in Asien (Wodecka, 2012).

1996 wurde eine weitere neue Spezies, *B. lonestari*, in *Amblyomma americanum*, einer Ixodes-Zecke der südlichen und östlichen USA entdeckt (Barbour, Maupin, Teltow, Carter, & Piesman, 1996). Wie *B. miyamotoi* kann auch *B. lonestari* Lyme-ähnliche Symptome hervorrufen, wie Erythema migrans (James et al., 2001). Jedoch zeigte die Sequenzanalyse, dass die Borrelie wie *B. miyamotoi* eher zur Gruppe der Rückfallfieber-Borrelien gehört (Armstrong et al., 1996). *B. miyamotoi, B. lonestari* und *B. theileri* (infiziert Rinder und Hirsche) (Brocklesby, Scott, & Rampton, 1963; Trees, 1978) sind die einzig bekannten Rückfallfieber-Borrelien, die in Ixodidae vorkommen.

Rückfallfieber-Borrelien sind in der Lage, durch die Antigenvariation das Immunsystem zu umgehen, indem sie mithilfe ihrer Oberflächenproteine verschiedene Regulatoren des Komplementsystems binden und somit hemmen (Grosskinsky et al., 2009; Grosskinsky et al., 2010; Hovis, McDowell, Griffin, & Marconi, 2004; Hovis et al., 2006; McDowell et al., 2003; Meri, Cutler, Blom, Meri, & Jokiranta, 2006; Rossmann et al., 2007; Schott, Grosskinsky, Brenner, Kraiczy, & Wallich, 2010). Zusätzlich findet eine Antigenvariation dank sogenannter "Variable Major Proteins" (*vmps*) an der Zelloberfläche statt. Sie ermöglichen eine stetige Oberflächenveränderung und können somit dem Immunsystem ausweichen. Ein Vergleich der *vmps*-Gene von *B. miyamotoi*

und *B. hermsii* wies auf starke Ähnlichkeiten hin (Hamase, Takahashi, Nohgi, & Fukunaga, 1996). *B. miyamotoi*zeigt kaum ortsspezifische Unterschiede. Stämme dieses Rückfallfieber-Erregers weisen insgesamt weniger ortstypische Diversitäten auf als die Stämme der Lyme-Borreliose (Bunikis et al., 2004).

I.4.b Beschreibung des Rückfallfiebers

Im Gegensatz zu *B. miyamotoi* werden andere phylogenetisch verwandte Rückfallfieber-Genospezies durch Läuse oder Lederzecken verbreitet. Das Läuse-Rückfallfieber kommt in Gebieten mit mangelnder Hygiene oder in Kriegs- und Krisenzeiten vor. Seit den beiden Weltkriegen gab es in Europa keine größeren Epidemien mehr; die Krankheit ist heute jedoch hauptsächlich in Afrika anzutreffen. Die Kleiderlaus, *Pediculus humanus corporis*, ist der Vektor von *B. recurrentis*, die über den Läusekot auf die Haut gelangt und vom Patienten versehentlich in die Wunden gerieben wird (Yimer, Mulu, Ayalew, & Abera, 2014). Das von Lederzecken übertragene Rückfallfieber kommt jedoch weltweit und unabhängig von Krisenzeiten vor, da die Reservoirtiere der Gattung *Ornithodorus* weit verbreitet sind (Hahn, 2009). Rückfallfieber-Borrelien, die von Lederzecken verbreitet werden, wie *B. hermsii*, *B. duttonii* und *B. crocidurae* werden direkt in die Haut injiziert (Scott, Wright, & Cutler, 2005; Yimer et al., 2014).

Die Erreger des Rückfallfiebers, wie auch *B. miyamotoi*, sind morphologisch identisch aufgebaut wie *B. burgdorferi* s.l., unterscheiden sich aber genetisch von ihnen (Hahn, 2009; A. Platonov, Maleev, & Karan, 2009). Auch das klinischen Bild ist unterschiedlich: Das periodische Fieber ist das Hauptsymptom der Rückfallfieber-Borrelien, das leicht mit dem Krankheitsbild der Malaria verwechselt werden kann (Scott et al., 2005). Die Organismen vermehren sich im Blut und weisen eine hohe Umbau- und Expressionsrate der Expressionskasseten in den *vlp* und *vsp* Genen auf (Dai et al., 2006), die für serotyp-spezifische Lipoproteine auf der Außenmembran (Barbour, 2002) kodieren, sodass die Borrelien durch die häufige Änderung ihrer Oberflächen das Immunsystem des Wirts täuschen und so schubweise hohes Fieber auslösen können (Fukunaga et al., 1995; Kitten, Barrera, & Barbour, 1993). Diese Schübe werden febrile und afebrile Phasen genannt. In der febrilen Phase sind die Erreger im Blut nachweisbar, während sie sich in der afebrilen Phase in innere Organe, wie Niere, Herz, u.a. zurückziehen, um anschließend bei einem Rückfall nach einigen

Tagen wieder ins Blut zu gelangen. Der Organbefall äußert sich in schweren entzündlichen Reaktionen, Blutungen und Nekrosen. Die genetische Information für die Oberflächenantigene liegt in speziellen Genkassetten. Während der afebrilen Phase unterliegen diese Gene einer raschen Rekombination und werden von den Wirtsantikörpern nicht mehr erkannt. Diese Phasen wiederholen sich mehrfach. Sobald der Wirt ein ausreichendes Antikörperrepertoire erreicht, klingen die Rückfälle wieder ab. Die Inkubationszeit beträgt 4-14 Tage. Das Rückfallfieber ist ähnlich der dokumentierten *B. miyamotoi*-Infektionen gekennzeichnet durch schwere Fieberanfälle von 39-41°C mit Schüttelfrost, starken Kopf-, Gelenk- und Muskelschmerzen und allgemeinem Kräfteverfall. Die febrile Phase dauert durchschnittlich 3-6 Tage und die afebrile Phase ungefähr 6-10 Tage (Hahn, 2009). Es kann zu 1 bis 10 Rückfällen kommen. Insgesamt kann das Läuse-Rückfallfieber durchschnittlich 13-16 Tage dauern, während das Zecken-Rückfallfieber mit bis zu 10 Jahrenlangwieriger ist (Heyman, 2004). Ca. 40% der unbehandelten, am Läuse-Rückfallfieber erkrankten Patienten und ca. 5% der am Zecken-Rückfallfieber Erkrankten können an den Folgeschäden der Organe, wie Herzinsuffizienz aufgrund einer Myokarditis, an zerebralen Blutungen oder Leberversagen sterben (Hahn, 2009).

Vorübergehende petechiale Exantheme in der ersten febrilen Phase sind möglich. Die Symptome sind abhängig von der Beschaffenheit des Immunsystems des Wirts und der Borrelienspezies. Hämaturie und Epistaxis sind selten, wohingegen gastrointestinale Beschwerden üblich sind. Über respiratorische und neurologische Symptome wurden in den USA, Europa und westlichen mediterranen Ländern berichtet, in Spanien außerdem über meningeale Symptome. Neuropsychiatrische Fälle sind beim Zecken-Rückfallfieber häufiger als beim Läuse-Rückfallfieber. Zusätzlich kann ein Thiamin- und Vitamin B-Mangel gegebenenfalls zu Neuritis oder Enzephalitis führen. Das Ausmaß der Erkrankung ist von der individuellen Anfälligkeit oder der geographischen Lage abhängig; so kann eine Infektion bei Europäern stärker ausgeprägt sein als bei Afrikanern oder das Zecken-Rückfallfieber sich in Ägypten und Pakistan gravierender entwickeln als in Polen oder Rumänien (Heyman, 2004). Derartige Krankheitsentwicklungen sind bei *B. miyamotoi* nicht bekannt.

I.5. *Borrelia miyamotoi*

I.5.a Entdeckung einer neuen Spezies

Im Oktober 1995 entdeckten japanische Forscher eine zuvor unbekannte Spezies. Diese wurde zufällig in *I. persulcatus* Schildzecken und im Blut von Nagetieren aus Japan nachgewiesen. In asiatischen Regionen werden humanpathogene Borrelien hauptsächlich durch *I. persulcatus* Zecken verbreitet. Die meisten aus diesen Arthropoden isolierten Spirochäten konnten als *B. burgdorferi* s.l. klassifiziert werden. Überraschenderweise waren jedoch einige Borrelien mit anderen strukturellen Eigenschaften ausgestattet. Sie besitzen ein kürzeres, 38 kDa großes Flagellin-Protein und eine einzelne 23S-5S rRNA-Einheit. Außerdem haben diese Spirochäten Ähnlichkeiten mit dem Rückfallfieberstamm *B. turicatae* bezüglich des 23S rRNA-Gens. Dieses Isolat wurde einer neuen Spezies zugeordnet: *Borrelia miyamotoi* HT31 (Fukunaga et al., 1995). Sowohl *B. miyamotoi* als auch andere Borrelien besitzen lineare Chromosomen. Die Größe des *B. miyamotoi* HT31 Chromosoms betrug jedoch ungefähr 925 kb, während das Chromosom von *B. turicatae* mit 951 kb größer ist (Takahashi & Fukunaga, 1996).

Durch DNA-DNA-Hybridisierung konnte zusätzlich eine Verwandtschaft mit anderen Erregern des Rückfallfiebers (*B. hermsii, B. turicatae, B. parkeri* und *B.coriaceae*) nachgewiesen werden. Die Ähnlichkteiten betrugen 24-51%. Ein DNA-Vergleich mit Erregern der Lyme-Borreliose, wie *B. burgdorferi, B. garinii* und *B. afzelii* betrug nur Ähnlichkeiten von 8-13% (Fukunaga et al., 1995). Auch der Vergleich der Flagellin-Gene (*fla*; *p41*) deutete auf eine nur entfernte Verwandtschaft mit den drei erwähnten Lyme-Borrelien hin (Fukunaga & Koreki, 1995).

I.5.b Vorkommen der *B. miyamotoi*

B. miyamotoi wird nicht nur von *I. persulcatus* Zecken in Asien übertragen, sondern auch von dessen nordamerikanischen Verwandten, I. *scapularis*, bei der es sich um den Hauptvektor der Lyme-Borreliose in Nordostamerika handelt (Burgdorfer et al., 1990; Lane, Piesman, & Burgdorfer, 1991), und *I. pacificus* aus Nordwestamerika (Salkeld, Cinkovich, & Nieto, 2014). *B. miyamotoi* infiziert zusätzlich *I. ricinus* Zecken in Europa. Durch die örtliche Trennung wurden drei Populationen geformt, die sich genetisch nur wenig voneinander unterscheiden. Dadurch können sie in drei Genotypen

unterteilt werden: Einen nordamerikanischen, einen europäischen und einen asiatischen (Bunikis et al., 2004; Crowder et al., 2014). Die Populationen der unterschiedlichen Regionen sind untereinander relativ homogen (Richter et al., 2003). Nach genauerer Untersuchung entdeckten Mun et al. im nordamerikanischen Genotyp einen Unterschied von 0,9% in einer 766-bp Region des Flagellin-Gens zwischen den *B. miyamotoi* aus *I. pacificus* und aus *I. scapularis* (Mun, Eisen, Eisen, & Lane, 2006). In der nordamerikanischen Zecken-Spezies *I. scapularis* wurde *B. miyamotoi* 2001 das erste Mal entdeckt. Die Borrelie konnte in sämtlichen Gebieten der USA, in denen die Lyme-Borreliose vorkommt, nachgewiesen werden (Krause et al., 2013). *I. scapularis* von der Ostküste der USA, aus New York, Connecticut und Pennsylvania, hatten Infektionsraten von 0-6%.In Indiana wurde eine Prävalenz von 12% gemessen. Die lokalen Vorkommensraten können stark variieren (Ogden et al., 2011). Auch in *I. pacificus* von der Westküste der USA wurde *B. miyamotoi* mit einer Prävalenz von 0,7-7,5% an 7 von 12 Stellen in Kalifornien gefunden (Salkeld et al., 2014). Die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu lato und *B. miyamotoi* in kalifornischen adulten *I. pacificus* waren mit 0,6% für *B. burgdorferi* sensu lato und 0,8% für *B. miyamotoi* aus derselben Region ähnlich. In Nymphen hingegen war die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu lato 2,5 mal höher als die von *B. miyamotoi* (3,2% vs 1,4%) (Padgett et al., 2014). In den USA kommt *B. miyamotoi* also von der Ostküste bis Kalifornien vor und im Süden bis Tennessee (Barbour et al., 2009; Mun et al., 2006; Rosen et al., 2012; Scoles et al., 2001). In Kanada beträgt die Prävalenz der *B. miyamotoi* 1,9-2,5%. Nahezu ein Drittel der mit *B. miyamotoi* infizierten Ixodes-Zecken war auch mit *B. burgdorferi* s.l. koinfiziert. Nüchterne Larven von wildlebenden I. *scapularis* aus Kanada waren in einer Studie von 2001 zu 3,8% mit *B. miyamotoi* infiziert (Scoles et al., 2001). *B. miyamotoi* wurde bis in den nördlichen Regionen Ontario und Nova Scotia in Kanada gefunden. Die Infektionsrate in Nordamerika erreichte bis zu 15,4% (Ogden et al., 2011).

In Europa wurde *B. miyamotoi* in zahlreichen Ländern nachgewiesen. 2002 erschien ein erster Bericht über *B. miyamotoi* in *I. ricinus* in Schweden (Fraenkel et al., 2002). In Deutschland wurde 2003 im Rheinland das erste Mal eine mögliche Infektion von Zecken mit *B. miyamotoi* untersucht. In der Studie wurde ein Durchschnittswert von 3,5% nachgewiesen, wobei sich diese Spirochäten von ihren amerikanischen und asiatischen Analogen genetisch nur leicht unterschieden und innerhalb derselben Region homogen waren (Richter et al., 2003). Die Prävalenz in Deutschland betrug in anderen Studien ca. 1,8% und in Tschechien durchschnittlich 2% (Crowder et al., 2014). Die

Prävalenz von *B. miyamotoi* in den Niederlanden beträgt 3,6% (Fonville et al., 2014). Dort wurden sogar Antikörper gegen *B. miyamotoi* in untersuchten Patienten- und Waldarbeiterproben gefunden (Jahfari et al., 2014). In Frankreich wurde eine Infektionsrate von 3% in Zecken festgestellt. 12% der mit *B.miyamotoi* infizierten Zecken in Frankreich waren mit *B. burgdorferi* s.l., hauptsächlich *B. garinii* koinfiziert (Cosson et al., 2014). In Estland beträgt die Prävalenz von *B. miyamotoi* 0,9%. In dieser Überlappungszone zweier Vektoren, *I. ricinus* und *I. persulcatus*, war die Prävalenz in *I. persulcatus* (2,7%) höher als in *I. ricinus* (0,4%). Die europäische Variante kam ausschließlich in *I. ricinus* vor, während die asiatische Variante sowohl in *I. ricinus*, als auch in *I. persulcatus* vorkam. Auch Koinfektionen mit *B. burgdorferi* s.l. wurden gefunden (Geller et al., 2012).

Asiatische *I. persulcatus* Zecken in Japan wiesen eine Prävalenz von 2% für *B.miyamotoi* auf, auch Koinfektionen wurden gefunden. Eine genauere Untersuchung ergab, dass es sich um denselben Genotyp handelte wie in Russland (Takano et al., 2014). In Russland wurden ebenfalls in mehreren Regionen nüchterne *I. persulcatus* Zecken auf eine Infektion mit *B. miyamotoi* untersucht. In Leningrad Oblast betrug die Infektionsrate 1,8%, in Sverdlovsk 2,9%, in Novosibirsk 4,5%, in Irkutsk Oblast 2,3% und in Khabarovsk Krai 2,5% (Fomenko et al., 2010). Zusätzlich untersuchten japanische Forscher in Hokkaido die Infektionsrate von *B. miyamotoi* in wilden Nagetieren. Diese wurde mit der Infektionsrate von zwei Lyme-Borrelienstämmen (*B. garinii* und *B. afzelii*) verglichen. *B. burgdorferi* s.l. infizierte adulte Tiere häufiger als juvenile und war durch einen jahreszeitlichen Gipfel von Juni bis August gekennzeichnet. *B. miyamotoi* hingegen kam in allen Altersgruppen ähnlich häufig vor und zeigte keine jahreszeitlich begrenzte Aktivität. *I. persulcatus* Nymphen und Larven sind in den wärmeren Monaten von Mai bis September aktiv. *B. miyamotoi*-Infektionen korrelierten stark mit der Larvenaktivität, was vermuten lässt, dass Larven für die Transmission dieser Spirochäten wichtig sind (Taylor et al., 2013). Als Hauptwirt der *B. miyamotoi* kommen Vögel und kleine Nagetiere in Frage (Krause, Fish, Narasimhan, & Barbour, 2015; Wagemakers, Jahfari, et al., 2017).

I.6. Medizinische Bedeutung von *B. miyamotoi*

I.6.a Klinische Symptome bei *B. miyamotoi*-Infektionen

Lange Zeit wurde dieser Spezies keine Beachtung geschenkt. Sie galt nicht als humanpathogen, bis 2011 in Russland die ersten dokumentierten Fälle von Humaninfektionen mit *B. miyamotoi* auftraten (Platonov et al., 2011). Seitdem wurden klinische Fälle aus mindestens vier Ländern berichtet.

Das Krankheitsbild umfasst Influenza-ähnliche Symptome, 39,5°C Fieber in Schüben, Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Müdigkeit, Erbrechen, Myalgie, wie auch zusätzlich neurologische, respiratorische, kardiale und ophthalmologische Komplikationen, die sich während einer Schwangerschaft verschlechtern können (Platonov et al., 2011; Sarksyan et al., 2011). In einigen Fällen trat ein Erythema migrans mit erhöhten CRP- und Prokalcitonin-Werten auf (Sato et al., 2014). Die genannten Symptome, sowie vereinzelt Schwindel, Durst, Übelkeit und Erbrechen können ca. 12 bis 16 Tage nach einem Zeckenbiss auftreten (Sarksyan et al., 2015).

All diese Symptome ähneln auch der Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA), weshalb auch Patienten mit dieser Infektion auf eine Infektion mit *B. miyamotoi* untersucht werden sollten (Chowdri et al., 2013). Verglichen mit der durch *B. garinii* verursachten Lyme-Borreliose war die Inkubationszeit bei *B. miyamotoi* länger und die Zeit vom Erscheinen der ersten Symptome bis zur klinischen Behandlung kürzer. Die Patienten wiesen mehr systemische Manifestationen, inklusive Kopfschmerzen und Fieber als *B. garinii* und *B. burgdorferi*-infizierte Patienten auf; auch das Fieber war höher (38,8-39,5°C) und die Dauer der Fieberschübe relativ kurz. Der Krankenhausaufenthalt war bei *B. miyamotoi*-infizierten Patienten im Durchschnitt doppelt so lang wie bei *B. garinii*-infizierten Patienten. Obwohl die peripheren Leukozyten und die Thrombozytenzahl niedriger waren als bei *B. garinii*-infizierten Patienten, waren sie noch im Referenzbereich. Es wurden außerdem eine vermehrte Proteinurie und ein Anstieg der Alanin-Aminotransferase und Aspartat-Aminotransferase (GOT und GPT) bei *B. miyamotoi*-infizierten Patienten gemessen. Im Gegensatz zu *B. garinii*-infizierten Patienten waren diese Leberwerte häufiger erhöht: 51-68% vs. 15-20%. Akute Infektionen mit *B. miyamotoi* waren stärker ausgeprägt als anfängliche Stadien der Infektionen mit *B. burgdorferi* (Platonov et al., 2011). Einige Patienten entwickelten IgG- und IgM-Antikörper gegen das Protein Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase (Molloy et al., 2015). Außerdem konnten in

Patienten unter einer *B. miyamotoi*-Infektion Koagulations- und Mikrozirkulationsstörungen, die zu Organfunktionsstörungen führen können, beschriebenwerden (Platonov et al., 2015). Im Falle eines immunsupprimierten Patienten aus Holland trat eine Meningoenzephalitis mit Gedächtnisausfällen und Gangstörung auf, ohne Fieber, aber mit Pleozytose und erhöhter Proteinkonzentration im Liquor bei unauffälliger cMRT. Ob *B. miyamotoi* bei immunologisch gesunden Patienten derartige neurologische Symptome verursachen kann, ist unklar (Hovius et al., 2013). Demnach wurden die Patienten mit viraler Symptomatik, aber Verdacht auf *B. miyamotoi* mit Doxycyclin und Amoxicillin (Krause et al., 2013) oder Minocyclin bzw. Ceftriaxon (Sato et al., 2014) behandelt. Im Falle des immunsupprimierten Patienten führten einmal täglich 2000 mg Ceftriaxon i.v. zur Genesung (Hovius et al., 2013). Die Symptome und pathologischen Laborparameter bessern sich in der Regel ungefähr 12 Tage nach Therapiebeginn (Sarksyan et al., 2015). Eine Koinfektion mit anderen *Borrelia* spp. oder mit sonstigen durch Zecken verbreiteten Erregern ist möglich und könnte den Krankheitsverlauf verschlimmern (Franke et al., 2013).

I.6.b Übertragung von *B. miyamotoi*

Im Gegensatz zu *B. burgdorferi* s.l. wird *B. miyamotoi* von infizierten weiblichen Zecken transovarial oder transstadial übertragen (Dibernardo, Cote, Ogden, & Lindsay, 2014; Platonov et al., 2011). 2001 wurde in ungefütterten *I. scapularis* Larven eine Prävalenz von 3,8% für *B. miyamotoi* gefunden, während keine transovariale Übertragung von *B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen werden konnte (Scoles et al., 2001). Seit der Entdeckung der Lyme-Borreliose waren Forscher jedoch der Überzeugung, dass *B. burgdorferi* s.l., wie auch andere Erreger in Ixodidae transovarial übertragen werden (Burgdorfer & Varma, 1967). Eine aktuellere Theorie besagt, dass *B. burgdorferi* s.l. von nicht infizierten *I. scapularis* Larven und Nymphen erst dann aufgenommen werden, wenn sie an infizierten Wirten Blut saugen (Rollend et al., 2013). Eine transovariale Übertragung von *B. burgdorferi* s.l. hätte erhebliche epidemiologische Folgen (Falco& Fish, 1988).

Es ist nicht genau bekannt, zu welchem Zeitpunkt während des Saugakts der Zecke *B. miyamotoi* über den Speichel in den Wirtsorganismus gerät (Schwan & Piesman, 2002). Bei *B. burgdorferi* s.s. findet die Transmission aus I. *scapularis* bekanntlich in den

frühen Phasen des Saugakts (Kahl et al., 1998) nach ungefähr 48 Stunden statt, während andere Rückfallfieber-Borrelien nur einige Minuten benötigen (Barbour, 2005).

I.6.c Kultivierung von *B. miyamotoi*

Das flüssige Standardmedium, Barbour-Stoener-Kelly-Medium (BSK), wurde in den letzten Jahrzehnten oft modifiziert. Es entstanden zusätzliche Medien wie BSKII, BSK-H und MKP, doch sie alle beinhalten Kaninchenserum. Zusätzlich wurden auch Medien mit anderen Tierseren supplementiert und für bestimmte Borrelien ein besseres Wachstum beschrieben (Barbour, 1984; Wang et al., 2004). Bis 2013 war *B. miyamotoi* aus Amerika nicht kultivierbar (Margos et al., 2015). Um Zellen zu züchten und DNA extrahieren zu können, wurden immungeschwächte Mäuse infiziert und sobald die Bakterienzahl über 10^7 Zellen/ml betrug, wurde den narkotisierten Tieren das Blut abgenommen (Hue et al., 2013). Ein optimales Wachstum der *B. miyamotoi* wurde letztendlich in einem Medium mit 30-50% hitzeinaktiviertem Humanserum und einer Atmosphäre aus 6% CO_2 erreicht (Margos et al., 2015). Andere Autoren berichteten aber auch von der erfolgreichen Kultivierung der *B. miyamotoi* Stämme LB-2001 und HT31 in modifizierten Kelly-Pettenkofer-Medium mit 10% fetalem Kalbserum (MKP-F), ähnlich der *B. burgdorferi*-Kultivierung(Wagemakers, Oei, Fikrig, Miellet, & Hovius, 2014). Die Inkubation von *B. miyamotoi* in 50% aktivem, humanen Serum zeigte keine Abweichung der Zellmorphologie und auch das Wachstum blieb unbeeinflusst. Die Borrelien sind in der Lage, die zentrale Komponente des Komplementsystems C3 zu überwinden, indem die Bildung der C3-Konvertase und die nachgeschaltete Kaskade gehemmt wird (Teegler, Herzberger, Margos, Fingerle, & Kraiczy, 2014). *B. miyamotoi* zeigt somit in Wirtsorganismen eine Resistenz gegen eine Bakteriolyse durch das Komplementsystem (Teegler et al., 2014; Wagemakers et al., 2014).

I.7. Medizinische Bedeutung

I.7.a Durch Zecken übertragene Erkrankungen

Multiple Krankheitsepisoden verursacht durch Borrelienbeeinflussen nicht nur die Gesundheit der Patienten ungünstig, sondern können ebenso kostspielig sowie langwierig sein und eine medizinische Fehldiagnose begünstigen. Infektionen mit *B. miyamotoi* könnten ungeklärt bleiben, da das Krankheitsbild recht unspezifisch erscheint. Sie kann leicht mit einer viralen Infektion oder einer anderen zeckenübertragenen Erkrankung, wie Lyme-Borreliose, Babesiose, Anaplasmose, oder Ehrlichiose verwechselt werden (Platonov et al., 2011). Diverse andere Keime infizieren zusätzlichZecken der Gattung *Ixodes* in Nordamerika, Asien und Europa. Seit 1976 ist eine Koinfektion der *I. scapularis* mit *Babesia microti* und seit 1994 mit A. *phagocytophilia* bekannt (Scoles et al., 2001). Nennenswert sind auch die viralen Erreger der Zeckenenzephalitis, der russischen Frühsommermeningoenzephalitis, der Powassan-Enzephalitis und das Hirsch-Zecken-Virus. Auch Piroplasmen befallen Zecken, wie *Babesia divergens*, *B. microti*, *B. odocoilei* und *B. gibsoni*. Andere zeckenübertragene Krankheitserreger sind *Rickettsia helvetica* und möglicherweise *Bartonella quintana.* Auch entomophagische Pilze und Nematoden wurden in diesen Zecken gefunden (Alekseev, Dubinina, & Jushkova, 2004; Franke et al., 2010; Franke, Hildebrandt, Meier, Straube, & Dorn, 2011; Hartelt et al., 2004; Hildebrandt et al., 2011; Reis, Cote, Paul, & Bonnet, 2011; Richter et al., 2003; Skotarczak, Rymaszewska, Wodecka, & Sawczuk, 2003; Wójcik-Fatla, Szymanska, Wdowiak, Buczek, & Dutkiewicz, 2009). Das Ausmaß der Symptome und die Dauer der Krankheit steigen bei Koinfektion auch mit anderen Erregern und sind stärker ausgeprägt als bei Einfachinfektionen (Franke et al., 2013; Krause et al., 1996). Dies kann eine gravierende Wirkung auf das klinische Krankheitsbild der Borreliose haben und eine Diagnose und Therapie erschweren (Krause et al., 2002; Nadelman et al., 1997; Swanson, Neitzel, Reed, & Belongia, 2006). Es ist oft schwierig, die Symptome der Lyme-Borreliose von anderen Krankheiten zu unterscheiden und eine eindeutige Diagnose ist daher oft nicht möglich, insbesondere, wenn sich der Patient an keinen Zeckenstich erinnern kann (Wilhelmsson et al., 2010). Zudem konnte in einer aktuellen Studie an Mäusen demonstriert werden, dass *B. miyamotoi* auch durch Bluttransfusionen übertragen werden kann (Krause, Hendrickson, Steeves, & Fish, 2015). Dies könnte ebenso gravierende gesundheitliche Auswirkungen auf

transfusionspflichtige Patienten im klinischen Alltag bedeuten, zumal die Borrelien eine Standardlagerung in sämtlichen humanen Blutkomponenten, außer Fresh Frozen Plasma, überleben (Thorp & Tonnetti, 2016).

Durch Zecken übertragene Erreger haben seit der Entdeckung der Lyme-Borreliose, Rickettsiose und Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA) in Europa zunehmend an Bedeutung gewonnen (Socolovschi, Mediannikov, Raoult, & Parola, 2009). So stieg beispielsweise in den letzten zwanzig Jahren die Zeckenenzephalitisrate deutlich an (Kollaritsch et al., 2011). Als Ursachen hierfür wurdenklimatische Veränderungen (Gray et al., 2009) oder sozio-ökonomische Faktoren (Godfrey & Randolph, 2011) in Betracht gezogen. Die häufigsten Erkrankungen sind jedoch die FSME und die Lyme-Borreliose (Logina et al., 2006).

I.7.b Diagnostik und Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Zum Nachweis von Rückfallfieberspirochäten wird z.B. in der Fieberphase gewonnenes Blut mikroskopisch untersucht. Die Sensitivität liegt bei über 70%, wenn der Blutausstrich mit Acridinorange gefärbt wird (Hahn, 2009). Auch *B. miyamotoi* ist in Blut nachweisbar (Barbour et al., 2009). Eine Infektion mit *B. miyamotoi* wurde bisher in Blutproben mit PCR oder durch den serologischen Nachweis von Antikörpern gegen die Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase diagnostiziert (Telford et al., 2015). Infizierte Patienten können zudem Antikörper gegen diverse Variable Major Proteins (*vmps*), wie z.B. anti-Vsp1 und Vlp15/16 IgM produzieren (Wagemakers, Koetsveld, et al., 2016).

Die Erreger der Lyme-Borreliose können molekularbiologisch schnell nachgewiesen werden. Normalerweise wird das *fla*-Gen (*p41*) benutzt, das für das Flagellin-Protein kodiert und *ospA, ospB* und *ospC,* die für Oberflächenproteine in Lyme-Borrelien kodieren. Zusätzliche signifikante Marker sind Gene, die für die bakterielle rRNA kodieren, wie *rrs* für 16S rRNA und nicht kodierende DNA-Regionen in Operonen, die ebenfalls Gene für die rRNA beinhalten (Guy & Stanek, 1991; Wodecka et al., 2010). Seit 2001 gehört der Nachweis des *fla*-Gens (*p41*) mithilfe der Real-Time PCR zur Routinediagnostik von *B. burgdorferi* s.l. (Schwaiger, Peter, & Cassinotti, 2001) und wurde seitdem weitgehend zur Untersuchung von Zeckenpopulationen und Patientenproben verwendet (Aguero-Rosenfeld, Wang, Schwartz, & Wormser, 2005). Im Jahre 2009 wurden erste Versuche unternommen, Multiplex Real-Time PCR-

Methoden zu entwickeln. Dadurch sollten mehrere Krankheitserreger, wie*B. burgdorferi* s.l., das FSME-Virus, A. *phagocytophillum* und *Ehrlichia muris*/E. *chaffeensis* parallel nachgewiesen werden können (Karan et al., 2010). Die Grundlage der Polymerasekettenreaktion ist die exponentielle Amplifikation eines DNA-Fragments. Dieses Prinzip wurde 1971 ertsmals beschrieben (Kleppe, Ohtsuka, Kleppe, Molineux, & Khorana, 1971) und 1985 wurde die thermostabile DNA-Polymerase vorgestellt (Mullis et al., 1992; Saiki et al., 1985). Eine doppelsträngige DNA wird zu zwei einzelsträngigen DNAs denaturiert und dupliziert. Hierfür werden eine DNA-Matrize (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase, mindestens zwei verschiedene ca. 15-25 Basen lange, synthetische Oligodesoxyribonukleotide, Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs), Puffer und Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) benötigt (Rassow, Hauser, Netzker, & Deutzmann, 2006; Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Dieser Zyklus wird während der Reaktion in der Regel 20-40 mal wiederholt, was unter optimalen Bedingungen einen konstant exponentiellen Anstieg des Reaktionsproduktes bedeutet. Die Polymerasekettenreaktion besteht aus den folgenden drei Phasen (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013):

Denaturierung: In der Phase der Denaturierung wird die Temperatur auf 93-96°C erhöht, sodass sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen lösen und das zweisträngige DNA-Fragment in zwei einzelsträngige Fragmente zerfällt. Außerdem werden alle enzymatischen Reaktionen angehalten. Die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA denaturiert, wird Schmelztemperatur bzw. *melting temperature* T_m genannt. Die Denaturierung ist von der Lösung, der Salzkonzentration, dem pH-Wert und dem Gehalt an Guanin-Cytosin und Adenin-Thymin-Bindungen abhängig. Eine G-C reiche DNA hat eine höhere T_m als eine T-A reiche DNA.

Anlagerung (Annealing): Die zweite Phase ist die Anlagerung der Oligonukleotide (Primer) an die einzelsträngige DNA bei einer *annealing* Temperatur T_a von in der Regel 55-65°C. Die Primer bestehen meistens aus kurzen Sequenzen von 15-25 Nukleotiden. Sobald die Temperatur sinkt, bilden sich erneut Ionenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren. Wenn schließlich die Primer an die DNA-Matrize oder Template gebunden haben, kann sich die DNA-Polymerase anschließen und mit der Replikation beginnen.

Verlängerung: Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase in einer Pufferlösung mit dNTPs und $MgCl_2$ wird das DNA-Fragment dupliziert. Mit ihrer 5' → 3' Aktivität

fügt die Polymerase dNTPs vom 5'-Ende zum 3'-Ende an, indem sie die Matrize vom 3'-Ende zum 5'-Ende liest.

Mithilfe der Real-Time PCR ist es im Gegensatz zur konventionellen PCR möglich, Daten während der Reaktionen durch Fluoreszenz in Echtzeit zu messen und zu sammeln (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Higuchi, Dollinger, Walsh, & Griffith, 1992). Eine Videokamera zeichnet gleichzeitig multiple Reaktionen auf, deren Ergebnisse in einer Amplifikationskurve dargestellt werden (Higuchi, Fockler, Dollinger, & Watson, 1993). Dadurch ist es möglich, die Ausgangskonzentration der DNA-Matrizen präzise, schnell und sauber darzustellen, da auch zusätzliche Arbeitsschritte vermieden werden und somit das Kontaminationsrisiko reduziert wird.

In dieser Methode können zwei unterschiedliche fluoreszierende Sondentypen verwendet werden: Hydrolysierende und hybridisierende Sonden (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Ein wichtiges Phänomen ist das FRET (fluorescence resonance energy transfer), bei dem ein Fluoreszenzsignal von einem Donor- an ein Acceptor-Fluorochrom geleitet wird. Am häufigsten werden die Donor-Fluorochrome (auch Reporter genannt) FAM (6-carboxyfluorescein), TET (tetrachloro-6-carboxyfluorescein) und HEX (hexacholoro-6-carboxyfluorescein) benutzt (Schwaiger et al., 2001). Die häufigsten Acceptoren (auch Quencher genannt) sind BHQ (Black Hole Quencher), BBQ (Black Berry Quencher), TAMRA und DABCYL(Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Hydrolysierende Sonden binden an ein von konventionellen Primern amplifiziertes DNA-Fragment und geben ein sofort messbares Fluoreszenzsignal frei, das proportional zur Konzentration der Zielsequenz intensiviert. Die bekanntesten Sonden sind sog. TaqMan Sonden. Diese haben an beiden Enden jeweils einen Reporter am 5'-Ende (Reporter dye) und einen Quencher entweder mittig oder am 3'-Ende (Quencher dye) gebunden. Aufgrund der Nähe absorbiert der Quencher das Fluoreszenzsignal des Donors, wodurch FRET entsteht. Die Sonde wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität einer *Taq* oder *Tth* DNA-Polymerase während derElongationsphase gespalten, wodurch der Quencher vom Donor-Fluorochrom getrennt wird, der nun ein Signal freigibt. T_m dermeisten Sonden beträgt 70°C, darum wird im TaqMan System in kombinierter Annealing und Polymerisationsphase 60-63°C erreicht, damit die Sonde sicher gebunden bleibt und die maximale 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Enzyme erreicht wird (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Hybridisierungssonden (Hyb-Probes, Light-Cycler-Sonden) werden während der PCR nicht hydrolysiert. Bei dieser Methode werden zwei Sonden verwendet, wovon eine am 3'-Ende einen Fluorescein-Farbstoff besitzt, welcher als Donor fungiert, und die andere am 5'-Ende an einen LC-Red-Farbstoff bzw. Akzeptor-Fluorochrom gebunden ist. Sobald die Sonden an die DNA binden, nähern sich die Fluorochrome an, sodass FRET entsteht, wobei ein Abstand von 10 nm notwendig ist. Während der PCR wird somit vom Donor eine Hintergrundfluoreszenz ausgestrahlt, die während der Annealing-Phase durch den Akzeptor in einer anderen Wellenlänge aufgelöst wird. Im Gegensatz zur hydrolysierenden Sonde wird bei den Hybridisierungssonden kein exponentiell steigendes Fluoreszenzsignal gemessen, sondern mit zunehmender Konzentration des Amplifikats abgeschwächt. Durch die fehlende Hydrolysierung bleibt das Fluoreszenzsignal reversibel und eine Schmelzkurve kann dargestellt werden (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013).

Die Fluoreszenzemission istproportional zur DNA-Synthese und wird schließlich in einer Amplifikationskurve in drei Phasen dargestellt:

1. Initiationsphase: Diese Phase findet während der ersten PCR Zyklen statt, in denen die emittierte Fluoreszenz nicht von der Basislinie unterschieden werden kann.
2. Exponentielle bzw. log-Phase: In dieser Phase nimmt die Fluoreszenz exponentiell zu.
3. Plateauphase: Der Graph erreicht ein Plateau aufgrund der erschöpften Reagenz.

In den ersten Zyklen wird die Fluoreszenz gemessen und die Basislinie ermittelt.

Sobald sich das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundsignal abhebt und den festgelegten Schwellenwert, threshold, erreicht, wird die Probe als positiv gewertet. Dieser Zyklus wird als C_p (*crossing point,PCR cycle*) oder C_t (*threshold cycle*) bezeichnet (Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2013). Eine Linksverschiebung der Kurve bedeutet, dass die Ausgangskonzentration der DNA erhöht war, sodass der Ct-Wert dementsprechend niedrig ausfällt (Wittwer et al., 1997).

I.7.c Therapie und Prävention

Das Läuse-Rückfallfieber wird mit Doxycyclin behandelt. Bei Zecken-Rückfallfieber muss Doxycyclin oder Erythromycin über 5-10 Tage verabreicht werden (Hahn, 2009). Eine Infektion mit *B. miyamotoi* kann täglich mit 2000 mg Ceftriaxon intravenös für zwei Wochen oder zweimal täglich 100 mg Doxycyclin oral für ebenfalls zwei Wochen behandelt werden (Platonov et al., 2011). Ein geeigneter Impfstoff gegen die Lyme-Borreliose wird noch erforscht (Comstedt, Hanner, Schüler, Meinke, & Lundberg, 2014; Tsao et al., 2004). Um das Rückfallfieber zu verhüten, muss die Bekämpfung der Läuse und ein guter Hygienestandard gewährleistet sein. Außerdem sollte, wie auch zur Prävention der Lyme-Borreliose und einer Infektion mit *B. miyamotoi*, ein Zeckenbefall vermieden werden (Hahn, 2009).

II. Fragestellung und Hinführung zum Thema

Aufgrund des sympatrischen Vorkommens von *B. miyamotoi* und Lyme-Borrelien in Schildzecken und der seit 2011 bekannten Humanpathogenität der ersteren Spezies, sollte sich die Medizin auf zukünftige Infektionen vorbereiten. Heutzutage ist ein simpler, schneller und sensitiver Routinenachweis einer Infektion in Zecken oder Patienten mit einer der genannten Erregergruppen notwendig.

- Mit Hilfe des Flagellin-Gens (*fla*B; *p41*) können Spezies aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex routinemäßig diagnostiziert sowie auch *B. miyamotoi* identifiziert werden. Aus diesem Grund ist das Flagellin-Gen einer der am häufigsten genutzten Marker für den Nachweis und die Identifizierung der Borrelien in Ixodes-Zecken.
Für das Screening von Zecken wurde im Rahmen meiner Arbeit amNationalen Referenzzentrum für Borrelien eine Real-Time PCR entwickelt und validiert, die sowohl als Simplex- als auch als Duplex-PCR verwendet werden kann. Vorteilhaft ist, dass man im Falle einer Infektion bzw. Koinfektion in der Lage wäre, mithilfe zweier fluoreszierender Sonden anhand des *fla*-Gens beide Erregergruppen einzeln oder simultannachzuweisen bzw. voneinander zu unterscheiden.

- Sensitivität und Spezifität sollten an verschiedenen Kulturproben aus dem Rückfallfieber- und *B. burgdoferi* s.l. Komplex, sowie an *B. miyamotoi* DNA aus Asien, Europa und USA getestet werden. Zur praxisnahen Anwendung sollte mittels der Duplex Real-Time PCR die Prävalenz der verschiedenen Borrelienspezies aus 1433 Zecken aus dem Siebengebirge, 828 aus dem Englischen Garten, 331 aus Grafrath und 60 aus Oberschleißheim, gesammelt in den Jahren 2011 bis 2014, bestimmt werden.

- Zusätzlich sollte anhand künstlich infizierter Patientenproben die Möglichkeit der zukünftigen Anwendung dieser Screeningmethode für Humanmaterial getestet werden.

Mithilfe der neuen Duplex Real-Time PCR wird die schnelle, einfache und simultane Erfassung von zeckenübertragenen Borrelien ermöglicht. Diese Methode soll nun in der vorliegenden Arbeit näher erläutert werden.

III. Material und Methoden

III.1. Herkunft der Zecken-DNA

III.1.a Beprobungsdetails

Die in dieser Arbeit untersuchten Zecken gehören zur Spezies I. *ricinus* und stammen aus zentraleuropäischen Gebieten, genauer aus dem Siebengebirge bei Bonn,
aus dem Englischen Garten in München und aus Grafrath und Oberschleißheim bei München, Deutschland. Mit Hilfe eines ca. 1x2m großen weißen Baumwolltuches, das über eine Wiese gezogen wurde (siehe Abbildung III.1.1), wurden die Zecken gefangen. Diese Methode wird nach dem Englischen "flagging" genannt. Nach zehn Metern wurden die Zecken von der Fahne gesammelt und in Reaktionsgefäße mit 70%- bzw. 80%-igem Ethanol gelegt und ins Labor zur weiteren Dokumentation der Anzahl, des Geschlechts und Zeckenstadiums gebracht. Dort wurden die Tiere bis zur DNA-Extraktion bei 4°C gelagert.
Die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit wurden an den Beprobungsorten stundenweise mit Langzeit-Dataloggern (EL-USB-Data Logger, Lascar EleCtronics, Whiteparish, UK) gemessen. Zusätzlich wurden auch während des Abflaggens die aktuelle Temperatur und Luftfeuchtigkeit in Bodennähe mit Kurzzeit-Dataloggern (EL-USB-Data-Logger, Lascar EleCtronics, Whiteparish, UK) im Minutentakt gemessen (Brenauer, 2015). Zur Bestimmung der Humidität des Bodens im Siebengebirge wurden Erdproben entnommen und gewogen, anschließend wurden die Proben getrocknet und erneut gewogen.
Desweiteren wurden das Datum, die Uhrzeit, Koordinaten (Längen-/Breitengrad), Höhenlage [m üNN], Landnutzung, Art der Vegetation, Beschattung [%] und der Sonneneinstrahlungswinkel gemessen. Alle Beprobungsdetails (vgl. Tabelle III.1.3) und Laborergebnisse wurden in einer relationalen Datenbank (Microsoft Access, Microsoft Corporation, Redmont, USA) dokumentiert (Brenauer, 2015).

Abbildung III.1.1: Darstellung der "flagging"-Methode. Vom weißen Baumwolltuch (links) wurden die Zecken mit einer Pinzette (rechts) aufgesammelt (Fotos von und mit Erlaubnis des NRZ Labors, LGL Oberschleißheim).

III.1.b Beprobungsort Siebengebirge

In den Jahren 2012, 2013 und 2014 wurden in den Monaten März bzw. April bis Oktober insgesamt 1.433 *I. ricinus* Zecken im Siebengebirge bei Bonn geflaggt.
Das Naturschutzgebiet Siebengebirge liegt süd-östlich von Bonn (Abbildung III.1.2). Das ehemalige vulkanische, hügelige Gebiet umfasst eine Gesamtfläche von ungefähr 4800 ha. Im Siebengebirge herrscht ein mildes subatlantisches Klima bei Höhen von 78-459 m üNN und einem jährlichen Niederschlag von 650 - 850 mm. Es wurden drei Untersuchungsflächen ausgewählt, die nach der dort vorliegenden Vegetation benannt wurden. Diese waren die Untersuchungsflächen "Frax" (50°39'53.2" Nord, 7°13'05.8" Ost, ca. 130 m üNN), benannt nach *Fraxino-Aceretum pseudoplatani* (Eschen-Ahorn-Schluchtwald). Zur vorherrschenden Fauna gehörten *Hedera helix* (Gemeiner Efeu), *Dentaria bulbifera* (Zwiebelzahnwurz) und *Viola reichenbachiana* (Waldveilchen).
Die Bezeichnung der Untersuchungsfläche "Luz" (50°39'51.5" Nord, 7°13'19.2" Ost, ca. 123 m üNN) hat ihren Ursprung von der Pflanzengesellschaft *Luzulo-Fagetum milietosum* (Waldflattergras-Hainsimsen-Buchenwald) mit einer dominanten Kraut- und Strauchschicht aus *Athyrium filix-femina*(Wald-Frauenfarn), *Oxalis acetosella* (Waldsauerklee) und *Hedera helix* (Gemeiner Efeu).
Als letztes wurde die Untersuchungsfläche "Gal" (50°39'37.1" Nord, 7°14'55.4" Ost, ca. 298 m üNN) nach *Galio-Fagetum typicum* (typischer Waldmeister-Buchenwald)

benannt. Auch hier bestand die Vegetation aus einer Kraut- und Strauchschicht, mit *Calamagrostis epigejos* (Land-Reitgras), *Melica uniflora* (Einblütiges Perlgras), *Milium effusum* (Waldhirse) und *Hedera helix* (Gemeiner Efeu)(Kurtenbach et al., 1995; Schwarz, Maier, Kistemann, & Kampen, 2009).

2012 wurden tagsüber bei einer ungefähren Temperatur von 7-24°C, relativer Luftfeuchtigkeit von 45 - 100% und möglichst wenig Regen und Wind an diesen Beprobungpunkten von April bis Oktober 335 *I. ricinus* gesammelt, da Zecken unter solchen Bedingungen am aktivsten waren (Schwarz et al., 2009). 12 Zecken konnten keinem Entwicklungsstadium zugeordnet werden. Von April bis Oktober 2013 konnten unter denselben Bedingungen 834 Zecken gesammelt werden. Zuletzt wurden 2014 in den Monaten März bis Juni 264 Exemplare gefangen, wovon im April 3 Zecken keinem Geschlecht zugeordnet werden konnten. Die restlichen Zecken sind in Tabelle III.1.1 gelistet.

Alle gefundenen Zecken wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C einzeln in Reaktionsgefäßen verstaut gelagert.

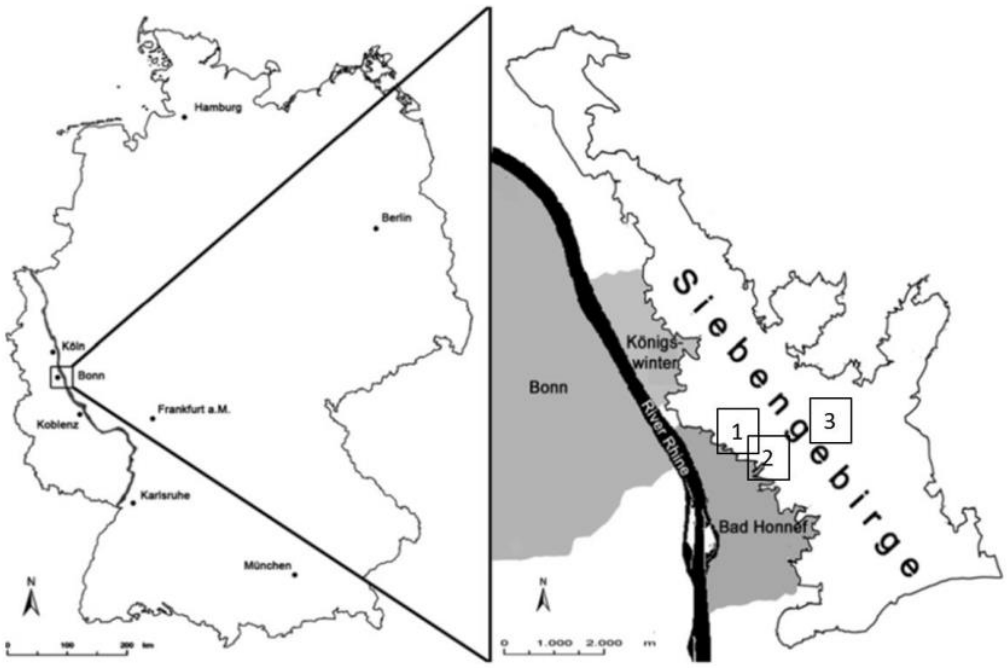


Abbildung III.1.2: Geographische Zuordnung des Naturschutzgebietes Siebengebirgemit den Beprobungsorten 1: "Frax", 2: "Luz" und 3: "Gal"(Schwarz et al., 2009).

III.1.c Beprobungsorte Englischer Garten (München), Grafrath und Oberschleißheim

Der Englische Garten gehört mit einer Fläche von 3,7 km^2 zu den beliebtesten und größten Stadtparks Deutschlands. Er ist von Straßen und Häusern umgeben und mit einer üppigen Vegetation versehen. Das Pflanzenrepertoire besteht hauptsächlich aus gepflegtem Rasen, Büschen, Sträuchern und Laubbäumen, v.a. Buche und Eiche. Der nördliche Teil des Parks wird ebenfalls durch Gartenbau gestaltet, beherbergt jedoch sowohl ein dichtes Gebüsch und Bäume wie auch seltener gemähte Wiesen. Dieses Gebiet wird auch zum Reiten genutzt (Fingerle et al., 2008; Silaghi et al., 2008).

Grafrath liegt ungefähr 7 km nördlich des Ammersees und 35 km westlich von München. Der Jahresniederschlag beträgt ca. 880 mm, wovon 520 mm von Mai bis September fallen und die Jahresmittel-temperatur liegt bei 7,8°C. In dem kiesig-sandigen Gebiet sind mehr als 200 verschiedene Baumarten beheimatet, viele zählen zu den neophytischen Arten (Burmeister, Goßner, & Gruppe, 2007). Der Beprobungsort lag auf einem grasigen Waldweg und in einem Mischwald (Fingerle et al., 2008).

Im Jahr 2011 wurden im nördlichen Teil des Englischen Gartens, München von April bis Dezember insgesamt 483 Zecken geflaggtund im Jahr 2012 wurden ebenfalls im Englischen Garten von April bis August 345 *I. ricinus* gefunden. Im April 2012 wurden in Grafrath, Landkreis Fürstenfeldbruck 331*I. ricinus* geflaggt. Im Schlosspark Lustheim, Oberschleißheim, Landkreis München konnten 60 *I. ricinus* Zecken gesammelt werden.

Die Anzahl der gesammelten Zecken ist in Tabelle III.1.2 dokumentiert.

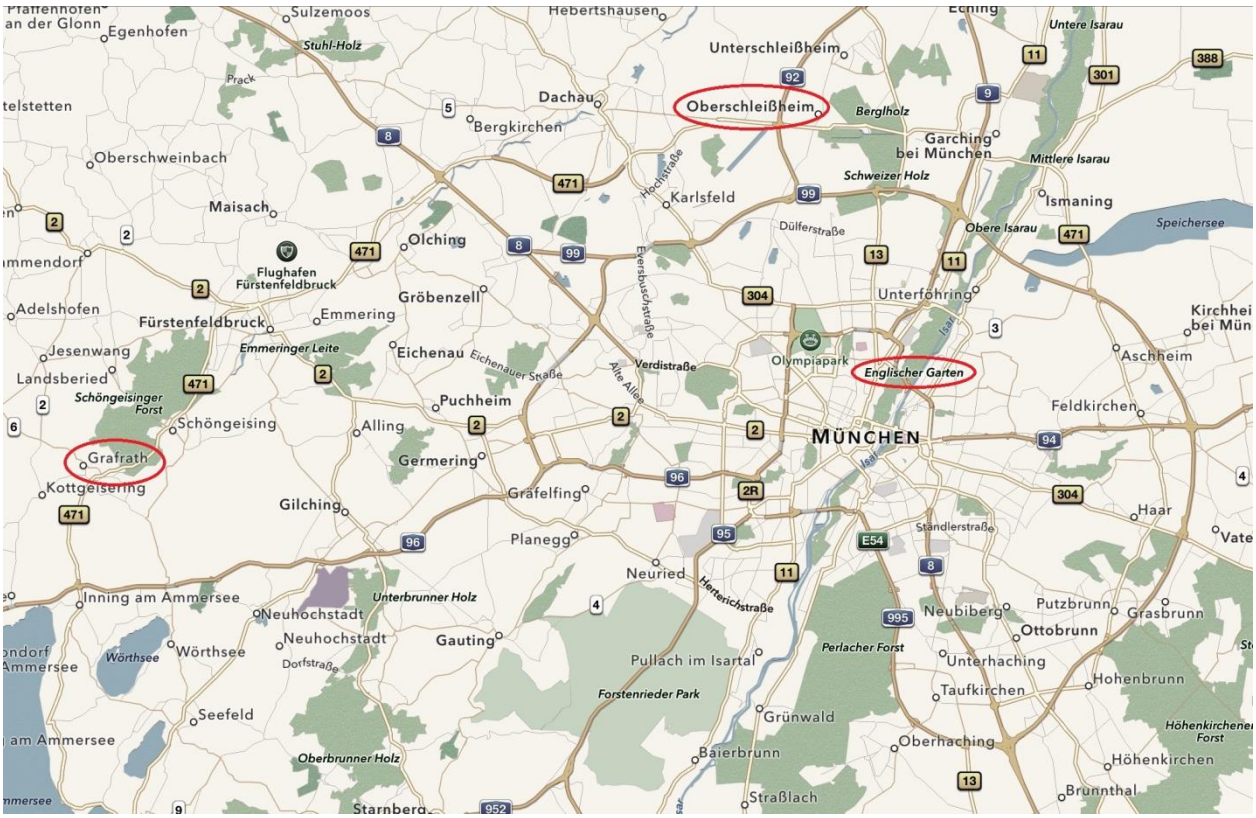


Abbildung III.1.3: Darstellung der drei Fanggebiete Grafrath, Oberschleißheim und Englischer Garten/München (Google Maps, 2017).

III.1.d Extraktion der Zecken-DNA

Für die DNA-Extraktion wurden die Zecken aus dem Siebengebirge in 100 µL 1,25 % Ammoniumhydroxid homogenisiert und anschließend bei 99°C für 20 min im Thermomixer (Eppendorf) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Homogenat bei 16.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde der Überstand auf ein Volumen von 30-50 µL bei 99°C im Thermomixer eingeengt und bei -80°C gelagert. Die DNA-Extraktion im Jahr 2013 wurde von Frau Anna-Katharina Steinmann (BA Studentin) durchgeführt. 2012 wurden die Zecken von Frau Alma Muminovic und 2014 von HerrnWissam Alsaidi extrahiert.

Die DNA der gesammelten Zecken aus München und Umkreis wurden von Frau Wiltrud Strehle und Frau Cecilia Hizo-Teufel mit dem BioSprint 96 DNA-Blood kit (Quiagen) extrahiert. Hierbei wurden die Zecken zunächst zerdrückt und danach in 180 µL Lysis Puffer (Roche) und 20 µL Proteinkinase K im S-Block vermischt, mit Folie (Eppendorf) abgedeckt und über Nacht bei 56°C im Thermomixer comfort bzw.

compact (Eppendorf) geschüttelt. Anschließend wurden die Gewebestücke nochmals zerdrückt und mit 500 µL PBS im Tissue Lyser (Quiagen) vermengt. Zu 100 µL homogenisiertem Gewebe wurden danach 180 µL Lysis-Puffer (Roche) und 20 µL Proteinkinase K in einen S-Block gegeben. Das Gemisch wurde erneut mit Folie abgedeckt und mindestens eine Stunde lang bei 56°C geschüttelt und anschließend in der Zentrifuge 5415D (Eppendorf) zentrifugiert. Währenddessen wurden andere Platten nach Protokoll vorbereitet. Der Ansatz für den S-Block Load Lysate bestand aus 200 µL Puffer AL, 30 µL MagAttract Suspension G und 200 µL Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt). Dieser 400 µL Ansatz wurde nun zum S-Block Load Lysate mit den Proben gegeben und das BioSprint Programm "DNA-Blood 2000" angewendet.

III.2. *p41* Real-Time Polymerasekettenreaktion

III.2.a *p41 B. burgdorferi*s.l. Simplex Real-Time PCR

Mithilfe des rekombinanten Plasmids *pB31/41-9* in *B. burgdorferi* s.l., das das *fla*-Gen des Flagellin-Proteins beinhaltet, wurde 2001 von Schwaiger et al. eine *one-tube fluorgenic* Real-Time PCR-Methode entwickelt, die es mithilfe einer fluoreszierenden Sonde ermöglicht, sowohl in Patientenproben wie auch in Zeckenisolaten alle Stämme des Spezienkomplexes nachzuweisen (Schwaiger et al., 2001). Die zahlreichen Spezies des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes weisen kaum Unterschiede innerhalb dieses Gens auf, weshalb eine genaue Identifikation weitere diagnostische Maßnahmen erfordert und lediglich der Erregerkomplex nachweisbar ist. Die Reaktion basiert auf der quantitativen Amplifikation des *fla*-Gens mit dem Forward Primer "FlaF1A" 5´ - AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A - 3´, Reverse Primer "FlaR1" 5´ - GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA - 3´ und der *Taq*Man Sonde "FlaProbe1" 5´ - FAM-TGC TAC AAC CTC ATC TGT AGC ATC TTT TAT TTG-BHQ-1 - 3´. Der fluoreszierende Donor-Farbstoff am 5'-Ende der Sonde ist FAM (6-carboxyfluorescein), der mit dem Acceptor-Fluorochrom BHQ (Black Hole Quencher) kommuniziert.

Der Mastermixansatz wurde in einem DNA-freien Raum pipettiert, bestehend aus 0,75 µL Forward Primer(Metabion, Planegg/Steinkirchen), 2,25 µL Reverse Primer (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 12,5 µL NoRox QT Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden), 0,5 µL Sonde (Metabion, Planegg/Steinkirchen) und 4 µL RNase freies Wasser (Jenapharm®). Der Reaktionsansatz wurde nun kurz mit einem Vortex Mixer (lab dancer S40, VWR) gemischt und anschließend mit einer Tischzentrifuge (Costar® Mini

Moldel 10,Scientific Industries, New York) zentrifugiert.Anschließend wurden in einem separaten Raum unter einer sterilen Werkbank (Hera Safe, Heraeus Instruments) jeweils 20 µL Ansatz in jede Position einer 96er PCR Platte (96 well PCR Plate semi-skirted, 4titude) pipettiert und 5 µL Zeckenisolat hinzugegeben. Zusätzlich lief in jedem Lauf eine Negativprobe mit, die statt des Probenmaterials Wasser enthielt. Danach wurde die Platte mit einer Klebefolie (4ti-0560, 4titude) verschlossen und mit Universal 320 (Hettich) für eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Stratagene MxPro Mx3005P bzw. Mx3000P (Agilent Technologies, Waldbronn) lieferte mit dem Programm MxProdas Ergebnis in Form eines Cycle Threshold-Wertes (Ct-Wert), der die Anzahl der Zyklen beschreibt, nach der eine Fluoreszenz gemessen werden kann und mit einem entsprechenden Graphen dargestellt wird. Das Thermalprofil in Tabelle III.2.1 wurde eingestellt.

III.2.b *p41 B. miyamotoi* Simplex Real-Time PCR

Zur Identifikation der *B. miyamotoi* wurden nach demselben, oben genannten Prinzip ein spezieseigener Forward Primer "BM_for1" 5´-TTG CTT GTG CAA TCA TAG CC-3´, Reverse Primer "BM_rev1" 5´-GCA AAT CTT GGT GCT TTT CAA-3´ und anfangs drei Sonden mit dem Programm Primer3 entwickelt und von Metabion, Planegg/Steinkirchen hergestellt.

"Sonde1" 5'GTT AGT TGT AGA TGC CAC AAT TTC ATC TGT CAT TA-BBQ-650-3'

"Sonde2" 5'Cy5-AGA TGC CAC AAT TTC ATC TGT CAT TA-BBQ-650-3'

"Sonde3" 5'Cy5-TGT AGA TGC CAC AAT TTC ATC TGT CA-BBQ-650-3'

Das *fla*-Gen der *B. miyamotoi* wurde mithilfe dieses Programms mit dem *fla*-Gen anderer Borrelien-Spezies aus dem sensu lato-Komplex und der Rückfallfieber-Familie verglichen. Es wurde nach geeigneten Missmatches gesucht, um *B. miyamotoi*-spezifische Sonden zu identifizieren. Der fluoreszierende Farbstoff der Sonde war Cy5 und als Akzeptor wurde BBQ (Black Berry Quencher) verwendet.

Diese Oligonukleotide wurden anschließend nach dem oben beschriebenen Verfahren der *p41* Real-TimePCR getestet und die Sensitivität der Sonden verglichen. Hierzu wurden die in den folgenden Tabellen gelisteten Borrelien-Stämme aus dem sensu lato Komplex und der Rückfallfieber-Familie und zusätzlich *B. miyamotoi* der drei

Populationen aus Japan (Konzentration 10,19 ng/µL), Europa (Konzentration 11,72 ng/µL) und USA (Konzentration 24,23 ng/µL) verwendet.

Stamm	**Konzentration [ng/µL]**
B. kurtenbachii	1,36
B. garinii OspA 7	4,33
B. garinii OspA 8	2,72
B. bissettiae	7,60
B. lusitanae	8,04
B. japonica	31,67

Tabelle III.2.2: Borrelien-Stämme aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex mit Konzentration zur Sensitivitätstestung der "Sonden 1,2 und 3".

Stamm	**Konzentration [ng/µL]**
B. duttonii	17,61
B. anserina	30,85
B. recurrentis	18,58
B. hermsii	17,38
B. parkerii	0,83
B.persica	2,28

Tabelle III.2.3: Borrelien-Stämme aus der Familie der Rückfallfieber-Spezies mit Konzentration zur Sensitivitätstestung der "Sonden 1,2 und 3".

III.2.c *p41 B. miyamotoi* und *p41 B. burgdorferi* s.l. Duplex Real-Time PCR

Als neue Real-Time PCR-Methode wurde eine Duplex PCR entwickelt, die aus der Kombination aus beidenSimplex-Arten besteht und der gleichzeitigen Erfassung beider Borrelien-Gruppen dienen soll. Dieser Ansatz besteht aus 0,75 µL Forward Primer "FlaFA1" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 0,75 µL Forward Primer "BM_for1" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 2,25 µL Reverse Primer "FlaR1" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 2,25 µL Reverse Primer "BM_rev1" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 0,5 µL Sonde "FlaProbe1" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 0,5 µL Sonde "Sonde2" (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 12,5 µL NoRox QT Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden) und 0,5 µL RNase freies Wasser (Jenapharm®), da von den ursprünglichen 4 µL Wasser die Summe aus Forward Primer, Reverse Primer und

Sonde der *p41 B. miyamotoi* Simplex Real-Time PCRabgezogen werden sollte. Die restlichen Arbeitsschritte entsprachen der *p41* Simplex Real-Time PCR.
Diese Methode wurde mit denselben Borrelien-Spezies aus den Tabellen III.2.2 und III.2.3 getestet.
Zusätzlich wurde ein Sensitivitätstest mithilfe einer Verdünnungsreihe aus Kultur-DNA von elf *B. burgdorferi* sensu lato Stämmen mit einer Verdünnungsreihe von *B. miyamotoi* durchgeführt.Folgende *B. burgdorferi* s.l. Stämme wurden verwendet:

Stamm	**Ausgangskonzentration von Genomäquivalent 10^4 [ng/µL]**	**Keimzahl/ml**
Pko (*B. afzelii*)	72,9	$3,4*10^8$
PBi (*B. bavariensis*)	219,0	$4,3*10^9$
PBr (*B. garinii*OspA 3)	78,0	$7,6*10^8$
PHei (*B. garinii* OspA 5)	50,0	$9,8*10^8$
PWudII (*B. garinii* OspA 6)	20,06	Nicht bestimmt
PRef (*B. garinii* OspA 7)	64,2	$7,5*10^8$
PLa (*B. garinii* OspA 8)	195,0	$3,6*10^9$
Psig (*B. spielmanii*)	62,6	$1,2*10^8$
VS116 (*B. valaisiana*)	68,4	$9,3*10^8$
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	53,1	Nicht bestimmt
PGeb (*B. bisettii*)	90,9	Nicht bestimmt

Tabelle III.2.4: 11 angezüchtete *B. burgdorferi* s.l. Stämmemit Ausgangskonzentration und Keimzahl, die mit *B. miyamotoi* DNA in einer Verdünnungsreihezum Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR verwendet wurden.

Der PCR-Ansatz wurde nach dem oben beschriebenen Schema zubereitet. Zu 20 µL Reaktionsansatz wurden 5 µL eines 1:1 Gemisches aus der DNA eines *B. burgdorferi* s.l. Stammes und des japanischen *B. miyamotoi*-Stammesmit der Ausgangskonzentration von 16,04 ng/µL hinzugegeben. Hierfür wurden 5 µL bereitgestellte Kultur DNA des *B. burgdorferi* s.l. Stammes mit oben stehenden Konzentrationen von 10^4 bis 10^{-1} Genomäquivalenten pro µLmit 5 µL *B. miyamotoi* Kultur-DNA der entsprechenden Verdünnungsreihe vermischt, sodass die Konzentrationen einander gegenläufig zu- bzw. abnahmen. Verdünnt wurde mit einer

Mischung aus TRIS-Puffer (AppliChem) und Thymus-DNA (Sigma). In der folgenden Tabelle ist jenes Schema dargestellt.

B.burgdorferi s.l. Verdünnung	*B. burgdorferi* s.l. C [Genomeäquivalenz]	*B.miyamotoi* C [Genomeäquivalenz]	*B.miyamotoi* Verdünnung
0	10^4	10^{-1}	1:1000000
1:10	10^3	10^0	1:100000
1:100	10^2	10^1	1:10000
1:100	10^2	10^2	1:1000
1:1000	10^1	10^2	1:100
1:10000	10^0	10^3	1:10
1:100000	10^{-1}	10^4	0

Tabelle III.2.5: Schematische Darstellung der Verdünnungsreihemit gegenläufigen Genomäquivalenzen zum Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR. Es wurde für jede der 11 genannten B. burgdorferi s.l. Stämme dieselbe Verdünnungsreihe verwendet.

Als Inhibitionskontrolle wurde zum Kultur-DNA-Gemisch zusätzlich reine Zecken-DNA hinzugegeben, die zuvor mittels PCR auf ihre Borrelien-Negativität getestet wurde. Der Sensitivitätstest wurde mit den Stämmen PBr (*B.garinii* OspA 3) PSig (*B. spielmanii*), VS116 (*B. valaisiana*), PGeb (*B. bisettii*) und *B. miyamotoi* aus Japan wiederholt. Es wurden jeweils 5 µL Kultur-DNA von *B. miyamotoi* und einem *B. burgdorferi* s.l. Stamm mit 10 µL Zecken- DNA vermischt. Aus dieser Mischung wurden wiederum 5 µL zu 20 µL Reaktionsansatz gegeben.

Anschließend wurde die *p41*Duplex Real-Time PCR zunächst an 50 Zecken aus dem Siebengebirge getestet, die zufällig aus dem Jahr 2013 ausgewählt worden sind. Die *B. miyamotoi* positiven Zecken wurden mit der konventionellen *glpQ* PCR nachgewiesen und anschließend sequenziert, um die Validität der neuen PCR Methode zu überprüfen. Daraufhin wurden alle restlichen Zecken aus dem Siebengebirge, dem Englischen Garten, Grafrath und Oberschleißheim gescreent und mit der *glpQ* PCR und MLST *recG* überprüft und ebenfalls sequenziert.

III.3. Weiterführende Diagnostik

III.3.a *glpQ* PCR

Das *glpQ*-Gen wurde in *Escherichia coli*erstmals entdeckt (Larson, Ehrmann, & Boos, 1983). Es kodiert für das Protein Glycerophosphodiester-Phosphodiesterase, das Phospholipide zu Alkohol und Glycerol-3-Phosphat hydrolysiert. Das *glpQ*-Gen ermöglicht, im Gegensatz zu Lyme-Borrelien, Rückfallfieber-Borrelien Glycerol-3-Phosphat aus Phospholipiden zu gewinnen und durch diesen metabolischen Vorteil eher im Blut vorzukommen als Lyme-Borrelien (Schwan et al., 2003). *B. miyamotoi* und auch andere Rückfallfieber-Borrelien können somit mittels der *glpQ*PCR nachgewiesen werden (Bacon, Pilgard, Johnson, Raffel, & Schwan, 2004).

Für einen 50 µL Ansatz werden zunächst 25 µL HotStar taq Master Mix (Quiagen GmbH, Hilden), 19 µL RNase freies Wasser (Quiagen GmbH, Hilden), 0,5 µL Forward Primer "glpQ-for" 5´ - CCA TTA ATT ATA GCT CAC AGA GGT GC- 3´ und 0,5 µL Reverse Primer "glpQ-rev" 5´- TCT GTA AAT AGG CCA TCT ACT TTT GC- 3´ benötigt. Dieser 45 µL Ansatz wird in 8er PCR Röhrchen (PCR Single Cap 8er-Soft Strips, Biozym Scientific GmbH, Oldendart) pipettiert und anschließend unter einer Lamina (Hera Safe, Heraeus Instruments) mit 5 µL DNA-Isolat vermischt. Neben einer Positivprobe aus 10^4-verdünnter Kultur-DNA-Extraktion von *B. miyamotoi* aus dem NRZ-Borrelien Labor im LGL lief eine Negativprobe von 5 µL Wasser mit. Die Röhrchen wurden im Mini Star silverline (VWR) zentrifugiert und in den Thermocycler (2720 Thermal Cycler bzw. ThermocyclerMastercycler nexus gradient, Eppendorf, Hamburg) gelegt. Das Thermalprofil in Tabelle III.3.1 wurde mit 30 Zyklen eingestellt.

Anschließend wurde das PCR-Produkt auf ein Agarose-Gel zur Gelelektrophorese aufgetragen.

Zusätzlich wurde ein Sensitivitätstest mit einer Verdünnungsreihe des japanischen *B. miyamotoi*-Stammes der Konzentration 10,19 ng/µL mit den Genomäquivalenten 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1} hergestellt und wie oben beschrieben durchgeführt.

III.3.b MLST

Das MLST (multilocus sequence typing) für *Borrelia* basiert auf acht *housekeeping*-Genen, die verglichen mit anderen Genen geringe genetische Variation aufweisen. Hierzu gehören *recG, clpA, nifS, uvrA, clpX, pepX, pyrG* und *rplB* (Hanincova et al., 2013; Margos et al., 2008). Zum Nachweis der Duplex-PCR wurde für die MLST Gene eine nested PCR verwendet, bei der zwei von acht Genen benutzt wurden, *recG* und *clpA* (vgl. Tabelle III.3.2). Anschließend wurden die PCR-Produkte sequenziert.
Für *B. miyamotoi* wurdendie Primer für diese acht Geneam Nationalen Referenzzentrum für Borrelien entwickelt und getestet. Die entsprechenden Primer-Kombinationen sind in Tabelle III.3.3dargestellt.

Gen	**PCR Primer**	**Sequenz**	**Annealing T. (°C)**	**PCR Profil**
recG	Rec908F (forward) Rec1779R (reverse)	5'-CTA G**Y**A TTC CT**Y** TAA TTG AGG C-3' 5'-TTC **R**GT TAA AGG TTC CTT ATA AAG-3'	53,4 52,3	TD 60-52°C, 45 Zyklen
clpA	BmclpAF1268 (forward) BmclpA2051R (reverse)	5'-TTG ATC TCT TAG ATG ATC TTG G-3' 5'-CAA ACA TAA ACC TTT TCA GCC TTT AAT A-3'	53,3 56,4	TD 58-50°C, 45 Zyklen

Tabelle III.3.2: Zur weiterführenden Diagnostik verwendete MLST-Primer für die *B. miyamotoi housekeeping*-Gene *recG* und *clpA*. Diese wurden in einer nested PCR verwendet.

Ein Reaktionsansatz der ersten Runde *recG* PCR bestand aus 18 µL Ansatz und 2 µL DNA. Im DNA-sterilen Raum wurden 10 µL HotStar taq Master Mix (Quiagen GmbH, Hilden), 5 µL RNase freies Wasser (Quiagen GmbH, Hilden), 1 µL $MgCl_2$ PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen), 1 µL Forward Primer "898F" 5' - GCK TTT CTM TCT AGY ATT CC - 3' und 1 µL Reverse Primer "1779R" 5' - TTC RGT TAA AGG TTC CTT ATA AAG - 3' in einem 2,0 µL Reaktionsgefäß von Eppendorf, Hamburg zusammengemischt. Nach kurzem vermischen im Vortex Mixer (K550 GE, Gemmy Industrial Corporation) und zentrifugieren mit der Mini Centrifuge (Coster) wurden vom Reaktionsansatz jeweils 18 µL in jede Position der 8er PCR Röhrchen (PCR Single Cap 8er-Soft Strips, Biozym Scientific GmbH, Oldendart) pipettiert, wonach die 2 µL

DNA unter der Lamina hinzugefügt wurden. Die vorbereiteten und beschrifteten Röhrchen wurden nun mit Galaxy MiniStar (VWR) zentrifugiert und in den Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Eppendorf, Hamburg) bzw. in den Thermocycler (Mastercycler nexus gradient, Eppendorf, Hamburg) gelegt, die anschließend mit dem Touchdown 60-52°C Thermalprofil gestartet wurden, wie es inTabelleIII.3.4 dargestellt ist.Nach Ablauf der Reaktion wurden 3 µL des PCR-Produkts in 27 µL eines neu, auf dieselbe Art angefertigten Reaktionsansatzes beigemengt. Dieser Ansatz bestand aus 15 µL HotStar taq Master Mix (Quiagen GmbH, Hilden), 9 µL RNase freies Wasser (Quiagen GmbH, Hilden), 1,5 µL Forward Primer "908F" 5' - CTA GYA TTC CTY TAA TTG AAG C - 3' und schließlich 1,5 µL Reverse Primer "1779R" 5' - TTC RGT TAA AGG TTC CTT ATA AAG - 3'. Es wurde dasselbe Thermalprofil verwendet.

Einige Proben erwiesen sich in der *recG* PCR aufgrund anfangs unklarer Sensitivität der Methode als negativ und wurden mit einer neuen Primer-Kombination getestet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und das Thermalprofil änderten sich nicht, es wurden lediglich die Primer neu kombiniert. So wurden in der ersten Runde 1 µL Forward Primer "908F" 5' - CTA GYA TTC CTY TAA TTG AAG C - 3' und 1 µL Reverse Primer "1779R" 5' - TTC RGT TAA AGG TTC CTT ATA AAG - 3' und in der zweiten Runde 1,5 µL Forward Primer "908F" 5' - CTA GYA TTC CTY TAA TTG AAG C - 3' und 1,5 µL Reverse Primer "1723R"5' - CAA CAC GRC CTC TAA TRT G - 3' verwendet.

Bei Verdacht auf eine Koinfektion mit *B. burgdorferi* s.l. wurden *B. miyamotoi*-positive Zecken mit der *clpA*-PCR nachgewiesen, um mögliche Kreuzreaktionen mit den Primern von *recG* zu vermeiden.

Der Reaktionsansatz bestand aus derselben Zusammensetzung mit dem Forward Primer "1268F" 5'- TTG ATC TCT TAG ATG ATC TTG G -3' und dem Reverse Primer "2051R" 5'- CAA ACA TAA ACC TTT TCA GCC TTT AAT A -3'. Diese entsprechen den Sequenzierungsprimern der Rückfallborrelien für *clpA*. Anschließend wurde das thermale Profil TD 55-48°C (TabelleIII.3.5) eingestellt.

Zusätzlich wurde zu den acht Genen jeweils ein Sensitivitätstest durchgeführt, bei der eine Verdünnungsreihe mit dem japanischen *B. miyamotoi*-Stamm der Konzentration 10,19 ng/µL mit den Genomäquivalenten 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1} hergestellt wurde. Die Versuche wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

III.3.c Gelelektrophorese und Sequenzierung

ZumNachweis der PCR-Produkte wurden sowohl die Produkte der *glpQ* PCR, wie auch von der nested MLSTüber eine Agarosegelelektrophorese analysiert. Zur Herstellung eines 1,5%-igen Gels wurden 100 mL 10 mM verdünnter TBE-Puffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 1,5 g Agarose (Biozym) und 8 µL GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) benötigt. Das Agarosepulver wurde mithilfe einer Waage (EW1500-2M, Kern & Sohn GmbH) abgemessen und in einem Reaktionsglas (Schott Duran) mit dem TBE-Puffer übergossen. Das Gemisch wurde nun in einer Mikrowelle (Siemens) bei 360 Watt für ungefähr zwei Minuten erhitzt, bis sich das Agarosepulver vollständig im Puffer gelöst hat. Das Gelred Nucleic Acid Gel Stain wurde anschließend beigefügt und mit einem Magnetrührer (IKAMAG RED-G) verrührt. Als nächstes wurde das flüssige Gel in die Kammer gegossen (Pequlab), die 20- bzw. 24- Kämme wurden hineingelegt und eine halbe Stunde zum Abkühlen aufbewahrt, bis das Gel ausgehärtet war.

Das nun fertige Gel wurde in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (PeQLab Biotechnologie GmbH) gelegt. Vom PCR-Produkt wurden jeweils 6 µL mit 2 µL Loading Dye (Thermo Schientific) gemischt. Zur Einordnung der Bandengröße wurde in die äußersten Taschen 1,5 µL GeneRuler 50 bp DNA-Ladder mit einer Konzentration von 05µg/µL, 50µg (Thermo Schientific) pipettiert. Anschließend wurde das Gel für eine Stunde an den Spannungsgeber (Consort E143, PeQLab Biotechnologie GmbH) mit 125 V angeschlossen.

Zur Veranschaulichung der Banden wurde das Gel unter eine UV-Lampe (Itf-Laborechnik GmbH & Co KG) gelegt und mit dem Programm BioCapt beschriftet und photographiert. Sobald Banden sichtbar waren, konnte das PCR-Produkt als positiv gewertet und zur Sequenzierung aufgereinigt werden.

Hierzu wurde das PCR Product Purification Kit (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim) benutzt, wobei als Erstes das gesamte PCR-Produkt auf eine Säule pipettiert und darauf 500 µL Binding Buffer aufgetragen wurde, damit das Produkt an die Säulenmatrix binden konnte. Die Säule wurde bei 13.000 rpm eine Minute lang mit derTischzentrifunge (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und anschließend in einen sauberen Säulenbehälter gelegt. Es wurden 500 µL Washing Buffer auf die Säule gegeben und eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, um kleinere DNA-Fragmente und Primer auszuwaschen. Dieser Vorgang wurde mit 200 µL Washing Buffer wiederholt. Danach wurden die Säulen in sterile Safe-lock tubes

Proben (Eppendorf, Hamburg) gelegt, 45 µL Elution Buffer hinzugegeben und wie oben zentrifugiert. So wurde das PCR-Produkt eluiert. Gearbeitet wurde unter der PCR-Lamina, UV2 PCR Workstation (UVP).
Um die Reinheit und die Menge des gereinigten Produkts zu überprüfen wurde erneut eine Gelelektrophorese durchgeführt, diesmal wurden jedoch 5 statt 6 µL Produkt mit 2 µL Loading Dye vermischt und von dieser Mischung 6 µL auf das Gel pipettiert.
War nur eine Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht zu sehen, konnten die restlichen 40 µL Produkt zum Sequenzieren vorbereitet werden, indem die Proben mit Barcodes versehen und an die Firma GATC-Biotech GmbH, Köln geschickt wurden, die die Sequenzierung durchführte. Sequenzierungsprimer wurden mitgeschickt. Für die Produkte der *p41* und der *glpQ*-PCR wurden Forward und Reverse Primer verschickt, für *recG* die Sequenzierungsprimer "909F" 5' - TAG CAT TCC TTT AGT TGA GGC - 3' und "1671R" 5' - CTC AGC ATG CTC AAC TAC C - 3'. Die fertigen Sequenzen wurden mit den Programmen "Lasergene" und "BioEdit Sequence Alignment Editor" ausgewertet. Der Sequenzabgleich erfolgte mit Hilfe der Online-Datenbank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

III.4. *hbb*-Schmelzkurvenanalyse

Das *hbb*-Gen kodiert für ein Histon-ähnliches Protein und wird in der Real Time PCR zu phylogenetischen Untersuchungen verwendet. Das *hbb*-Gen kann jedoch nicht zur eindeutigen Identifizierung aller *B. burgdorferi*-Spezies benutzt werden, dennoch ist es möglich, mithilfe zweier Primer, Forward Primer "Hbb640" 5'-GTA AGG AAA TTA GTT TAT GTC TTT (red640)T-3' und Reverse Primer "Hbb Bw" 5'-TAA GCT CTT CAA AAA AAG CAT CTA-3', sowie einer fluoreszierenden Sonde "ProbeHbbFluo2" 5'-CAA TGT CTG ACT TAG TAA CCT TTG GTC TTC TTG A-FLUO-3' dieses Genzu amplifizieren und mit der entstandenen Schmelzkurve die DNA-Proben in näherungsweise der jeweiligen Stämme zuzuordnen (Portnoï et al., 2006). Die drei Populationen von *B. miyamotoi* wurden ebenfalls mittels Schmelzkurvenanalyse untersucht.
Ein PCR-Ansatz besteht aus 1,0 µL Forward Primer (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 0,4 µL Reverse Primer (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 0,4 µL Sonde (Metabion, Planegg/Steinkirchen), 12,5 µL NoRox QT Master Mix (Qiagen GmbH, Hilden) und 0,7 µL RNAsa freies Wasser (Jenapharm®). Der Reaktionsansatz wurde nun wie

beschrieben kurz gemischt und anschließend zentrifugiert. Von diesem Gemisch wurden jeweils 15 µL in jede Position einer 96er PCR Platte (Framestar® 480/96, 4titude) pipettiert.

Der Ansatz wurde in einem DNA-freien Raum zusammengesetzt, um eine Kontamination zu vermeiden, während die zusätzlichen 5 µL DNA in einem separaten Raum unter einer Lamina (Hera Safe, Heraeus Instruments) hinzugegeben wurden.

Als Positiv-Kontrollen wurden acht Stämme aus Haltung und Anzucht im NRZ Borrelien Labor des LGL verwendet, die mit dem High Pure PCR Template Kit (Roche) isoliert wurden. Folgende Stämme wurden verwendet:

Kontrollstamm	**Serotyp**	**Spezies**
PGau	2	*B. afzelii*
PFin	4	*B. bavariensis*
PKa2	1	*B. burgdorferi* s.s.
PHei	5	*B. garinii*
PBr	3	*B. garinii*
PotiB2	Kein ST	*B. lusitaniae*
PSig2	Kein ST	*B. spielmanii*
PVS116	Kein ST	*B. valaisiana*

Tabelle III.4.1: Für die *hbb* Schmelzkurvenanalyse verwendete acht angezüchtete Kontroll-Stämme aus dem NRZ Borrelien Labor.

Zusätzlich sollte eine Negativkontrolle mitlaufen, bei derein entsprechendes Volumen Wasser eingesetzt wurde. Anschließendwurde die Platte mit einer Klebefolie (4ti-0560, 4titude) verschlossen, mit Universal 320 (Hettich) zentrifugiert und in den LightCycler® 480 (Roche, Mannheim) gelegt. Die Auswertung der Reaktion erfolgte mit dem Programm LC480, in dem die Funktion "Macro hbb" eingestellt wurde. Das Thermalprofil ist in Tabelle III.4.2 dargestellt.

Das Prinzip dieser Reaktion ist ebenfalls das oben beschriebene FRET-Verfahren. Sobald sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor vergrößert, nimmt FRET und das Fluoreszenzsignal des Akzeptors ab und des Donors zu, sodass ein charakteristischer Schmelzpunkt gemessen werden kann. Die Schmelztemperaturen in Tabelle III.4.3 dienen zur Orientierung.

III.5. Versuch zur Screeningmethode im humanmedizinischen Bereich

Ferner wurde getestet, ob die neue Sonde der *p41 B.miyamotoi* Simplex Real Time PCR auch an Patientenproben funktionieren könnte. Hierzu wurden gespikte Patientenproben in Form einer Verdünnungsreihe hergestellt, indem zunächst *B. miyamotoi* angezüchtet und anschließend mit menschlichen Proben vermischt wurden, wie EDTA-Vollblut (Biomex), Blutserum (Biomex), Kniegelenkspunktat und Liquor. Sowohl das Kniegelenkspunktat als auch der Liquor waren negative Patientenproben und Restbestände aus dem NRZ Borrelien Labor, LGL, Oberschleißheim. Die Borrelien wurden mit diesen Proben vermengt und mit der jeweiligen menschlichen Flüssigkeit verdünnt, bis eine Reihe von 10^4, 10^3, 10^2, 10^1, 10^0, 10^{-1} Genomäquivalenzen entstand. Zusätzlich wurde als Positivprobe eine Verdünnungsreihe mit PBS-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe) und Negativproben aus Probenmaterial ohne Borrelien hergestellt.

III.5.a Kultivierung von *B. miyamotoi*

Zur Kultivierung von *B. miyamotoi* werden in der Regel 100 ml Grundmedium, 20 ml 7%-ige Gelatine (Merck), 7 ml Rinderserum (Sigma) und 127 ml Humanserum (Biomex) benötigt. 5l Grundmedium wurden im NRZ Borrelien Labor, LGL, Oberschleißheim aus 500 ml CMRL-1066 (Gibco), 4500 ml Aqua bidest (Fresenius Kabi), 25 g Neopepton (Difco), 30 g Hepes (Sigma), 3,5 g Sodium citrat (Sigma), 15 g Glucose (Sigma), 40 g Pyrcivic Acid (Sigma), 2 g N-acetylglucosamin (Sigma) und 10 g Sodium bicarbonat(Sigma) hergestellt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,6 eingestellt.

Für den folgenden Versuch wurden 20,2 ml Medium benötigt. Dieses bestand aus 7,5 ml Grundmedium, 2 ml Gelatine, 0,7 ml Rinderserum und 10 ml Humanserum. Das Humanserum wurde zuvor zur Inaktivierung von Complementkomponenten für 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Das Medium wurde in einem 45 ml Röhrchen (Falcon) vorbereitet, zum Vermischen geschwenkt und auf elf Positionen einer Gewebekulturplatte (Greiner bio-one) mit je 1,5 ml verteilt. Zur Vermeidung einer Kontamination mussten alle Gläseröffnungen mit dem Bunsenbrenner sterilisiert werden. 2 ml *B. miyamotoi* wurden bei minus 80°C aufbewahrt. Diese stammten von Steven L. Sviat, CDC vom 23.08.2005 und gehörten zum japanischen Stamm HT31, vierte Subkultur. Von den Borrelien wurden je 0,5 ml zum Medium in die Felder der

Kulturplatte gegeben; damit waren vier Felder mit Borrelien versehen, das übrige Medium wurde ohne Bakterien in den restlichen sieben Feldern zur Subkultivierung aufbewahrt. Nun wurde die Platte gemeinsam mit einem CO_2-Indikator (Becton, Dickinson and Company) und einem CO_2Gen^{TM} 2,5l Atmosphere Generation System (Thermo Scientific) zur künstlichen Herstellung einer CO_2-reichen Atmosphäre in einen CO_2-Topf (Aerobjar, Becton Dickenson) gelegt und bei 33°C für 4 Tage bebrütet.
Am vierten Tag wurde der Kultivierungsprozess kontrolliert, indem von den 4 Feldern auf jeweils einen Objektträger (Th. Geyer) 15 µL pipettiert und mit einem 24x32 mm Deckglasbedeckt und anschließend in einem Mikroskop (Dialux20^{EB}, Leitz) betrachtet wurden. Zunächst waren nur wenige, kaum bewegliche Borrelien nachweisbar, sodass die Kultur weitere zwei Tage bebrütet wurde und zusätzlich 50 µL zur Subkultivierung in neues Medium gegeben wurden. Nach diesen zwei Tagen waren in den Subkulturen keine Spirochäten nachweisbar, lediglich in den länger bebrüteten Medien, sodass das gesamte Volumen von 2 ml der vier Felder in 2 ml Eppendorfgefäße gegeben wurden und für 20 min bei 12.000 rpm (5415D, Eppendorf) zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen, sodass ca. 500 µL Sediment und Mediumrest übrigblieben. Davon wurden zur Keimzahlbestimmung erneut 13 µL auf einen Objektträger pipettiert und diesmal mit zwei 24x32mm Deckgläsern bedeckt, sodass die Flüssigkeit über die komplette Oberfläche des Objektträgers verteilt war. Die Keimzahl betrug ca. $3x10^6$ Borrelien/µL.

III.5.b Herstellung gespikter Patientenproben

Nun sollte eine Verdünnungsreihe angefertigt werden, wobei in 1,5 µL Eppendorfgefäße jeweils 66 µL Borrelien in 134 µL EDTA-Blut, Serum, Kniegelenkspunktat, Liquor und PBS-Puffer gegeben wurden, sodass ein Ausgangsgenomäquivalent von 10^4/5µL entstand. Diese Mischung wurde nun mit der jeweiligen Flüssigkeit schrittweise 1:10 verdünnt, bis die erwünschte Reihe entstand, wieTabelle III.5.1 verdeutlicht.So konnten gespikte Proben von *B. miyamotoi*-infizierten Patienten hergestellt werden.
Um diese Proben mit der *p41*PCR untersuchen zu können, musste die DNA extrahiert werden, wozu das Maxwell® 16 LEV Blood DNA Kit (Promega Corporation, Madison, USA) verwendet wurde.

Zunächst wurden 200 µL Incubation Buffer zu den Proben gegeben, dann 200 µL Lysis Buffer, 30 µL Proteinkinase K und 10 µL RNase A (Quiagen), die zuvor von 100 mg/ml auf 10 mg/ml verdünnt wurde. Das Gemisch wurde zwei Stunden lang bei 65°C im Thermomixer (comfort bzw. compact, Eppendorf) inkubiert, anschließend mit 300 µL Lysis Buffer vermengt, im Vortexer gemischt und in Kartuschen (Promega) gegeben. In 1 ml Eppendorfgefäßen wurden 90 µL Elution Buffer vorbereitet. Die Kartusche wurde daraufhin in den Maxwell® 16 gestellt, der mit Hilfe paramagnetischer Partikel (MagnaCel^{TM} particle, Promega), die DNA bindet, reinigt und anschließend mit dem vorbereiteten Elution Buffer eluiert.
Anschließend wurde die p41 *B. miyamotoi* Simplex Real-Time PCR wie oben beschrieben vorbereitet und durchgeführt.
Die Konzentration der Proben wurde mithilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometers (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) gemessen und mit dem Programm Nanodrop ND-1000 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.5.1 eingetragen.

III.6. Material

Es wurde stets mit Pipetten von Eppendorf, Hamburg (0,5-10, 2-20, 10-100, 50-200, 2-1000 µL), Pipettenspitzen ep T.I.P.S. dual filter von Eppendorf, Hamburg, Corning undBiozym (Safe Seal-Tips® professional) in den Größen 10, 20, 100, 200, 1000 µL und den folgenden Handschuhen: N-Dex (ShowaBest Glove, Inc, Menlo, USA), Nitril Next Gen (Rösner Mautby Meditrade GmbH,Kiefersfelden) und Kimtech Science purple Nitrile (Kimberly Clark, Inc, Surrey, UK) gearbeitet.

IV. Ergebnisse

IV.1. Sondentestung

IV.1.a Spezifität der *p41*-Sonden

Der Vergleich von drei entwickelten Sonden für eine *B. miyamotoi p41* Simplex Real-Time PCR ergab für "Sonde2" die spezifischsten Ergebnisse.
Alle Sonden reagierten positiv mit allen drei *B. miyamotoi* Stämmen, JAP, USA und EU, jedoch lieferten die Sonden 1 und 3 auch positive Werte für andere Borrelien spp., besonders für *B. bissettiae*und vier andere Rückfallfieber-Borrelienspezies (vgl. Tabelle IV.1.1).
B. bissettiae und *B. parkeri* lieferten mit allen drei Sonden positive Ergebnisse, jedoch hatte *B. bissettiae* bei "Sonde2" nur einen hohen Ct-Wert von über 40, weshalb diese Sonde in den folgenden *p41* Duplex Real-Time PCRs verwendet wurde.

IV.1.b *p41 B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. Simplex & Duplex Real-Time PCR

In der *p41* Duplex PCR mit der *B. miyamotoi*-spezifischen Sonde "Sonde2" und der *B. burgdorferi* s.l.-spezifischen Sonde "FlaProbe1" ergab *B. bissettiae* kein Signal, während die Rückfallfieber-Borrelie *B. parkeri* (34.83) und wie erwartet alle drei *B. miyamotoi* Stämme, JAP (15.88), USA (12.76) und EU (27.14)im Cy5-Kanal positive Werte lieferten. Der Ct-Wert deseuropäischen *B. miyamotoi*-Stammes war im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen etwas höher. Dies ist dadurch zu erklären, dass diese DNA aus I. *ricinus* gewonnen wurde und die restlichen zwei DNA-Proben aus Kulturen stammten, also reine Borrelien-DNA darstellten. Im FAM-Kanal wurde für die meisten *B. burgdorferi* s.l. Genospezies ein positives Signal registriert, mit Ausnahme von *B. lusitaniae* und *B. japonica*. Von den Rückfallfieber-Borrelien waren *B. hermsii* (21.97) und *B. parkeri* positiv, wobei letztere einen hohen Ct Wert von über 40 besaß, der laut unserer Definition als negativ zu werten ist (vgl.Tabelle IV.1.1).

Im Spezifitätstest der beiden Sonden "Sonde 2" und "FlaProbe1", durchgeführt in Form einer *p41* Simplex Real-Time PCR, wurde mit "Sonde2" bei zehn verschiedenen Lyme-Borrelienstämmen (Genomäquivalenz 10^4) in Abwesenheit von *B. miyamotoi* DNA im Cy5-Kanal kein positives Ergebnis registriert. Parallel wurden zusätzlich jeweils zehn Reaktionen mit Mischungen aus denselben Lyme-Borrelienstämmen (Genomäquivalenz 10^4) und *B. miyamotoi* (Genomäquivalenz 10^2) durchgeführt. Wie erwartet wurden im Cy5-Kanal für alle zehn Mischungen Ct-Werte zwischen 32.00 und 34.32 registriert. Dies bedeutet, dass "Sonde2", durch Beimischung von *B. burgdorferi* s.l. DNA unbeeinflusst, ausschließich *B. miyamotoi* DNA detektierte.

Der Spezifitätstest mit "FlaProbe1" in der *p41* Simplex Real-Time PCR hatte unter denselben Bedingungen bei denselben zehn gemischten Probenim FAM-KanalWerte von 23.95 bis 24.92 (vgl. Tabelle IV.1.2). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, dass die Sonde "FlaProbe1" auf verschiedene *B. burgdorferi* s.l. Spezies gleichermaßen spezifisch reagiert, trotz Beimischung von *B. miyamotoi*-DNA.

Wurden die beiden Sonden als Duplex PCR kombiniert, hatte eine Mischung aus *B. miyamotoi* und *B. garinii* (Genomäquivalenz jeweils 10^4) im Cy5-Kanal ein Ergebnis von 26.05 und im FAM-Kanal 26.18. Somit lieferten beide Sonden ein äquivalentes Ergebnis, sowohl in der Simplex- als auch in der Duplex-PCR. Bei der Duplex-PCR wurde im Vergleich zur Simplex-PCR keine Veränderung der Ct-Werte beobachtet.

IV.2. Sensitivitätstest

IV.2.a Verdünnungsreihe zur Testung der *p41* Duplex Real-TimePCR

Bei reziproken DNA-Mischungen von *B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. (*B. miyamotoi* 10^{-1}/Bbsl 10^4; *B. miyamotoi* 10^0/Bbsl 10^3; etc. siehe Tabelle III.2.5) ergab sich bei der Mischung von *B. miyamotoi*mit der Genomäquivalenz 10^{-1} mit elf Lyme-Borrelienspezies mit der Genomäquivalenz 10^4 im Cy5-Kanalkein positives Ergebnis, während im FAM-Kanal die Ct-Werte zwischen 24.03 und 28.44 lagen (vgl. Tabelle IV.2.2). Eine Mischung aus *B. miyamotoi* der Genomäquivalenz 10^0 und Lyme-Borrelien der Genomäquivalenz 10^3 lieferte in der Duplex PCR ein positives Ergebnis im Cy5-Kanal von 39.83; drei Proben hatten einen Ct-Wert von über 40. Die Genomäquivalenz von 10^1 war schon in zehn von elf Proben positiv mit Werten zwischen 35.24 und 39.51 (vgl. Tabelle IV.2.3). Mit zunehmender Genomäquivalenz bei *B. miyamotoi* sanken die Ct-Werte konstant bis zu Werten zwischen 24.02 und

26.95 bei der maximalen Genomäquivalent 10^4 im Cy5-Kanal (vgl. Tabelle IV.2.8). Gleichzeitig erhöhten sich die Werte im FAM-Kanal konstant mit jeder sinkenden log-Stufe (vgl. TabellenIV.2.2-IV.2.8). Eine Genomäquivalenz von 10^2 lieferte für *B. miyamotoi* und für *B. burgdorferi* s.l. ähnliche Werte. Dies deutet darauf hin, dass die Primer und Sonden eine ähnliche Sensitivität haben und sich nicht gegenseitig inhibierten (vgl. Tabelle IV.2.5).

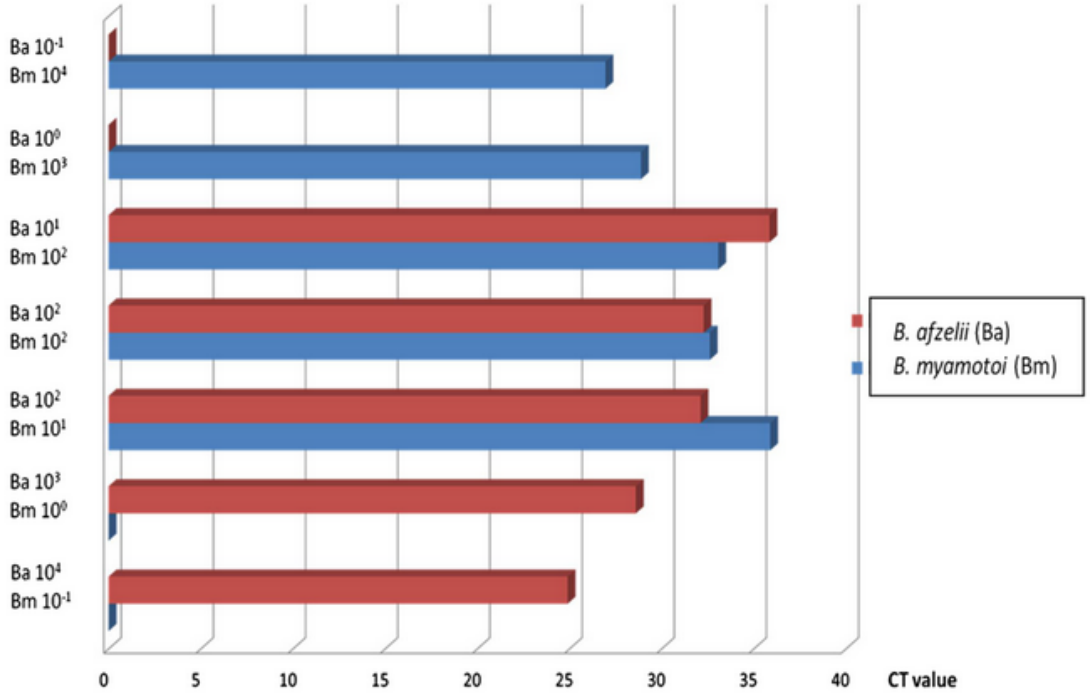


Abbildung IV.2.1: Darstellung der Ct-Werte einer gegenläufigen Verdünnungsreihe mit *B. miyamotoi* und einem *B. afzelii* Stamm (PKo) zur Sensitivitätstestung der *p41* Duplex Real-Time PCR. Die Ct-Werte gleicher Genomäquivalenzen blieben äquivalent, was auf eine ähnliche Sensitivitätder Primer und Sonden schließen lässt. Die Ergebnisse mit den restlichen *B. burgdorferi* s.l. Spezies waren vergleichbar.

Vergleichbare Ergebnisse gab es auch in der entgegengesetzt verlaufenden Verdünnungsreihe von *B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l.. Auch im FAM-Kanal wurden die Lyme-Borrelien erst ab einer Genomäquivalenz von 10^0 bis 10^1 nachgewiesen (vgl. Tabellen IV.2.6-IV.2.7).

Stieg die Genomäquivalenz um eine log-Stufe an, so sank der Ct-Wert der jeweiligen Probe um ca. 2-3 Punkte. Dies galt auch umgekehrt bei einer sinkenden Genomäquivalenz, bei der der Ct-Wert anstieg. Die Ct-Werte der einzelnen gegenläufigen Verdünnungen waren sowohl für den *B. burgdorferi* s.l. Stamm (in Abbildung IV.2.1 mit *B. afzelii* als Beispiel) als auch für *B. miyamotoi* in der jeweiligen

Genomäquivalenz ähnlich. Die meisten Stämme waren schon bei einer Genomäquivalenz von 10^1 nachweisbar.

Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^2	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	**32.17**	**31.24**
PBi (*B. bavariensis*)	**32.16**	**33.60**
PBr (*B. garinii* OspA3)	**31.78**	**31.99**
PHei (*B. garinii* OspA5)	**32.74**	**33.76**
PRef (*B. garinii* OspA7)	**33.53**	**33.89**
PLa (*B. garinii* OspA8)	**34.13**	**34.95**
PSig (*B. spielmanii*)	**32.97**	**34.46**
vs116 (*B. valaisiana*)	**32.73**	**33.16**
PGeb (*B. bissettiae*)	**32.33**	**34.95**
PWudII (*B.garinii* OspA6)	**32.00**	**32.75**
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	**34.50**	**34.30**

Tabelle IV.2.5: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* der Genomäquivalenz 10^2 und elf Lyme-Borrelienstämmeder Genomäquivalenz 10^2.

IV.2.b Verdünnungsreihe der *p41* Duplex Real-Time PCR mit Zecken-DNA

Eine Wiederholung der Verdünnungsreihe mit vier Vertretern des *B. burgdorferi* s.l. Spezieskomplexes, *B. miyamotoi* und zusätzlicher Beimischung von gereinigter Zecken-DNA wiesweder im Cy5- noch im FAM-Kanal große Abweichungen auf.

Die Genomäquivalenz 10^{-1} lieferte keine Ct-Werte, während eine Genomäquivalenz von 10^4 bei *B. burgdorferi* s.l. zwischen 26.73 und 30.11 (vgl. Tabelle IV.2.9) und bei *B. miyamotoi* zwischen 26.00 und 27.27 lag (vgl. Tabelle IV.2.15).

Dieselbe Genomäquivalenz bei *B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. von 10^2 ergab sowohl im Cy5- wie auch im FAM-Kanal positive Werte, die zwischen 32.73 und 35.34

im Cy5-Kanal und zwischen 33.83 und 39.00 im FAM-Kanal lagen (vgl. Tabelle IV.2.12).

Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^2 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*B. garinii* OspA3)	**33.18**	**33.83**
PSig (*B. spielmanii*)	**33.11**	**35.34**
Pvs116 (*B. valaisiana*)	**32.73**	**34.00**
PGeb (*B. bissettiae*)	**35.34**	**39.00**

Tabelle IV.2.12: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* der Genomäquivalenz 10^2 und vier Lyme-Borrelienstämme der Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit Zecken-DNA.

Wie oben beschrieben sanken bzw. stiegen die Ct-Werte mit zunehmender bzw. sinkender Genomäquivalenz auch in den Versuchen mit Zecken-DNA (vgl. Tabellen IV.2.9 bis IV.2.15). Das Vorhandensein von Zecken-DNA scheint die Sensitivität der *p41* Duplex Real-Time PCR nicht zu beeinflussen. Die Ct-Werte waren verglichen mit dem vorherigen Versuch mit reiner Borrelien-DNA ähnlich.

IV.2.c *B. miyamotoi* Screening von 50 Zeckenproben aus dem Siebengebirge 2013 mittels *p41* Simplex Real-Time PCR

Um zu testen, ob die PCR durch Zecken-DNA beeinflusst wird, wurde die Simplex-PCR mit "Sonde2" an 50 zufällig gewählten *I. ricinus* Extraktionen aus dem Siebengebirge 2013 getestet. Es wurden jeweils ca. 10 Proben aus den Monaten Mai, Juni und August gewählt, während aus Juli 6, aus September 9 und aus Oktober 5 Proben zur Verfügung standen.

In diesem Screening wurden drei *B. miyamotoi* positive Zecken gefunden, von denen zweimithilfe der *glpQ* PCR und anschließender Sequenzierung bestätigt werden konnten. In Abbildung IV.2.16 sind die Ergebnisse der *glpQ* PCR für diese 3 Proben dargestellt. Die beiden Proben "G10 9/13 3/3" (Ct-Wert 24.91) und "G7 10/13 1/2" (Ct-Wert 38.28) aus dem Beprobungsort Gal wurden im September 2013 und Oktober 2013

gesammelt."F8 8/13 1/1" mit dem Ct-Wert 28.10 wurde im August 2013 im Beprobungsort Frax geflaggt.

Die Proben "G10 9/13 3/3" und "F8 8/13 1/1" wiesen ein PCR-Produkt der erwarteten Größe auf, während "G7 10/13 1/2" negativ war. Diese Probe wies mit 38.28 in der *p41* PCR einen relativ hohen Ct-Wert auf, was auf eine geringe DNA-Konzentration hindeutet und somit die negative *glpQ* PCR erklären könnte. Durch Sequenzierung konnte in beiden positiven Proben eine Infektion mit einem europäischen *B. miyamotoi*-Stamm bestätigt werden.

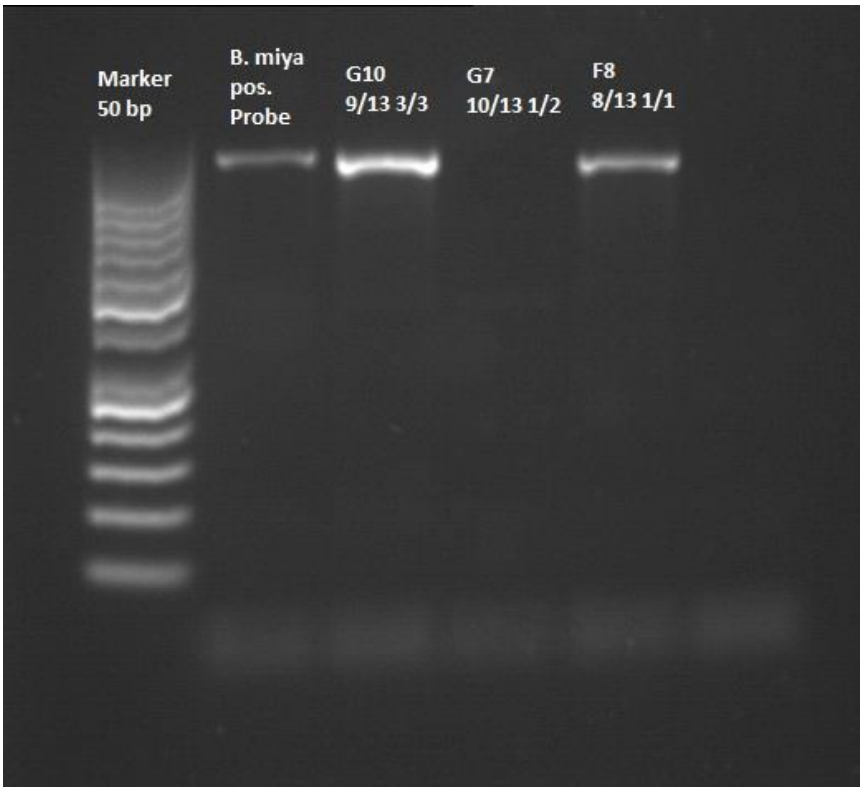


Abbildung IV.2.16: Agarosebild der *glpQ* PCR von den drei *B. miyamotoi*-positiven Probenaus der vorangegangenen *p41* Simplex Real-Time PCR. Als Marker wurde GeneRuler 50 bp DNA-Ladder verwendet und als Prositivkontrolle die Kultur-DNA des japanischen *B. miyamotoi*-Stammes. Zwei von den drei Proben aus dem Siebengebirge 2013 ("G10 9/13 3/3" und "F8 8/13 1/1") erwiesen sich als positiv in der weiterführenden Diagnostik und konnten durch Sequenzierung bestätigt werden.

IV.3. Zeckenscreening

In folgendem Beispiel eines Amplifikationstests mit Zecken-Proben aus dem Siebengebirge von August 2013 sind die Kurven positiver Reaktionen dargestellt, die im Stratagene McPro30005 gemessen wurden. Die beiden blauen Kurven sind Beispiele für eine positive Amplifikation im Cy5-Kanal und sind somit *B. miyamotoi*-positive Proben. Die vier grünen und zwei gelben Kurven sind hingegen Beispiele positiver Reaktionen im FAM-Kanal, bzw. *B. burgdorferi* s.l.-positive Proben. Die Ct-Werte für *B. miyamotoi* waren häufig höher als die Ct-Werte für *B. burgdorferi* s.l.. In dem abgebildeten Beispiel beträgt der Unterschied bis zu acht Zyklen. Auffallend waren zusätzlich Abweichungen der Fluoreszenzintensität in den beiden Kanälen. *B. burgdorferi* s.l.-positive Proben wiesen eine bis zu 4-mal stärkere Fluoreszenz [dR] auf als *B. miyamotoi*-positive Proben (vgl. Abbildung IV.3.1).

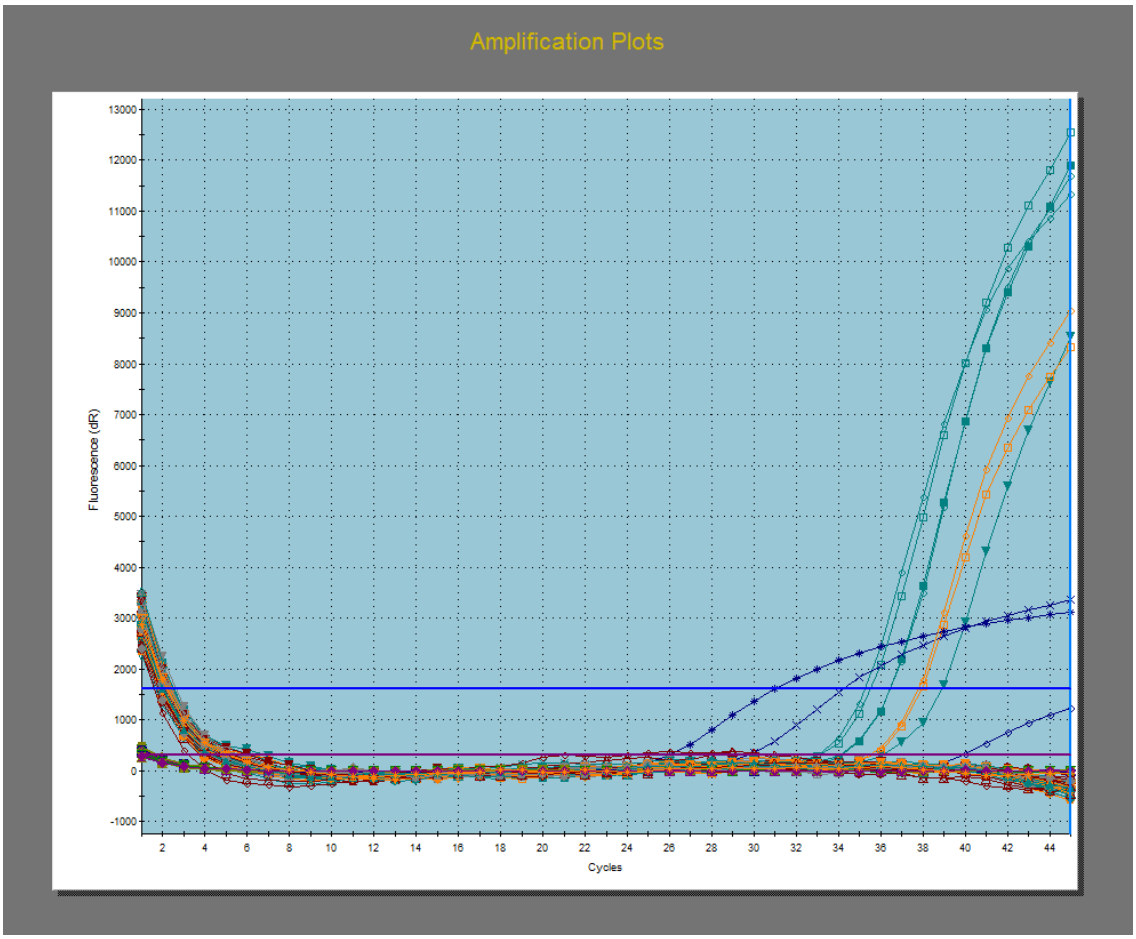


Abbildung IV.3.1: Amplifikationskurven der Zecken-Proben aus dem Siebengebirge von August 2013 im Stratagene MXPro30005. Die Fluoreszenz (dR) ist in Abhängigkeit zur Anzahl der Zyclen (Cycles) dargestellt. Insgesamt liegen 87 negative Proben vor, deren Fluoreszenz unter 1600 dR liegen, sowie 2 positive für Cy5 (blaue Kurven) und und 6 positive für FAM (vier grüne und zwei gelbe Kurven).

IV.3.a Zecken aus dem Siebengebirge 2012

Im Jahr 2012 wurden im Siebengebirge von April bis Oktober in drei Beprobungsorten (Luz, Gal, Frax) insgesamt 31 *B.burgdorferi* s.l.-positive Zecken von 335 gefunden. Die Ct-Werte in FAM reichten von 27.02 bis 39.92. Insgesamt betrug die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. im Jahr 2012 9,3%. In den einzelnen Monaten erreichten die Prävalenzen im Frühling, z.B. April, 19,5% bis hin zu 24,3% im Mai. Diese Werte sanken im Sommer auf nur 5,9% im Juni und stiegen in den Hochsommermonaten Juli und August wieder auf Werte von 15,8% bzw. 12,5% an. Im Herbst sanken die Werte erneut, wie im September auf 1,2%, bzw. auf 3,8% im Oktober. Es wurden von allen Beprobungsorten überwiegend Zecken aus Gal geliefert, somit stammten die meisten *B. burgdorferi* s.l. Proben aus Gal.

Von den Zecken aus dem Siebengebirge 2012 waren in der *p41* Duplex Real Time PCR 13 Proben positiv für *B. miyamotoi* mit Ct-Wert zwischen 18.58 und 39.39. Die Prävalenz von *B. miyamotoi* im Jahr 2012 beträgt somit 3,9%.

Hier stiegen die Prävalenzen in den Sommermonaten von 4,9% im April bis hin auf 9,8% im Juni an, während im Laufe des Sommers die Werte auf 0% im August bzw. in den Herbstmonaten September und Oktober auf 1,2% bis 2,6% sanken. Obwohl die meisten Zecken aus dem Beprobungsort Gal stammten, wurden sowohl in Gal als auch in Frax ähnlich viele *B. miyamotoi*-positive Zecken gefunden (vgl. Tabelle IV.3.2).

Eine Probe von April 2012 lieferte in der PCR den Hinweis auf eine Koinfektion mit *B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. mit einem Ct-Wert im Cy5-Kanal von 29.01 und im FAM-Kanal von 29.87. Zur Vermeidung einer Kreuzreaktion mit den *recG* Primern in der nested MLST PCR wurde mit dieser Probe "G8 4/12 N4/4" eine *glpQ* PCR durchgeführt, die sich in der anschließenden Gelelektrophorese als negativ herausstellte.

Mit den restlichen *B. miyamotoi*-positiven Proben wurde zur Überprüfung eine *recG* nested MLST PCR durchgeführt. Nur sechs von den insgesamt 13 positiven Zecken lieferten Banden bei 600 - 700 bp. Diese besaßen Ct-Werte zwischen 19.96 und 37.41 im Cy5-Kanal. Durch die Sequenzierung konnte eine Infektion der Zecken mit europäischen *B. miyamotoi* bestätigt werden (vgl. Tabelle IV.3.3).

IV.3.b Zecken aus dem Siebengebirge 2013

Von den im Jahr 2013 geflaggten Zecken lieferten in der Duplex Real-Time PCR 60 Zecken ein positives Ergebnis für *B. burgdorferi* s.l.. Die Ct-Werte lagen zwischen 29.73 und 39.86. Folglich ergibt in dieser Lage die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. im Jahr 2013 7,2%. Die *hbb*-, MLST PCR und anschließende Sequenzierung ergaben, dass *B. garinii* mit 28,3% und *B. afzelii* mit 25% am häufigsten vertreten waren, gefolgt von *B. valaisiana* mit 16,7% und *B. burgdorferi* s.s. mit 18,3% (vgl. Tabelle IV.3.4). Werden die einzelnen Monate betrachtet, ergaben die Prävalenzen für *B. burgdorferi* s.l. das ganze Jahr über konstant hohe Werte zwischen 4,7% im April und 8,9% im Juni 2013. Erst in den Herbstmonaten ab September stieg die Prävalenz auf bis zu 15,4% an (vgl. Tabelle IV.3.5).

Aus dem Siebengebirge 2013 lieferten insgesamt 21 Zecken ein positives Ergebnis für *B. miyamotoi*. Die Prävalenz von *B. miyamotoi* beträgt somit 2,5% im Jahr 2013. Die Prävalenzen waren das ganze Jahr über konstant niedrig bei 0,9% im Juni und 1,1% im April bis hin zu 3,8% im August und maximal 8,8% im Oktober. Tabelle IV.3.5 lässt erschließen, dass *B. miyamotoi*-positive Zecken in allen drei Beprobungsorten anzutreffen waren, ebenso waren auch *B. burgdorferi* s.l. infizierte Proben gleichmäßig verteilt.

3 von 21 Proben wurden, wie oben beschrieben mit einer *glpQ* PCR überprüft. Die restlichen 17 Proben mit Ct-Werten zwischen 22.30 und 39.93 wurden weiterführend mit der *recG* nested MLST PCR kontrolliert.

11 Proben mit den Ct-Werten zwischen 22.30 und 39.54 wiesen bei der *recG* MLST positive Banden bei 600 - 700 bp und 2 Proben (25.07 und 28.38) bei der *glpQ* PCR bei 700 - 800 bp auf und konnten durch eine anschließende Sequenzierung bestätigt werden (Tabelle IV.3.6).

IV.3.c Zecken aus dem Siebengebirge 2014

Von den Zecken aus dem Siebengebirge 2014 hatten 22 einen positiven Wert für *B. burgdorferi* s.l.; die Werte lagen zwischen 29.50 und 39.12. Somit beträgt die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. 8,3%. Die Prävalenzen betrugen in den Frühlingsmonaten März 4,7% und April 1,4%. Ab Mai stiegen die Prävalenzen von 11,1% auf 17,9% im Juni an.Wie in Tabelle IV.3.7 dargestellt, wurden die meisten positiven Proben im Beprobungsort Gal nachgewiesen.

In der *p41* Duplex Real-Time PCR waren 8 Proben positiv für *B. miyamotoi* (Ct-Werte: 23.03-36.77). Die Prävalenz von *B. miyamotoi* beträgt somit 3%. Die höchsten Monatsprävalenzen wurden im März mit 6,2% und im Mai mit 4,2% errechnet, während im April keine *B. miyamotoi* infizierten Proben vorkamen und im Juni die Infektion 1,8% betrug.

Mithilfe einer *recG* nested PCR sollte die Infektion bestätigt werden. Drei Proben (mit den Ct-Werten 27.88 bis 32.09) waren positiv und zeigten Banden bei der zu erwartenden Größe der PCR Produkte von 600-700 bp. Die anschließende Sequenzierung sicherte den Verdacht auf eine Infektion mit der europäischen *B. miyamotoi* (vgl. Tabelle IV.3.8).

IV.3.d Zecken aus dem Englischen Garten 2011

Aus dem Englischen Garten 2011 lieferten von den 483 Proben 72 ein positives Ergebnis für *B. burgdorferi* s.l., deren Werte zwischen 29.40 und 39.89 lagen. Die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. beträgt also im Jahr 2011 14,9%. Mit Ausnahme von Juni mit 5,1% lagen die Prävalenzen in den Frühlings- und Frühsommermonaten von April bis Juli zwischen 15,7% und 17,1%. Ab August erhöhten sich die Prävalenzen auf 33,3%, 22,2% im Oktober und 20% im November (vgl. Tabelle IV.3.9).

Außerdem wurden 12 *B. miyamotoi*-positive Proben gefunden, die anschließend mit *recG* PCR untersucht wurden.Obwohl sechs Proben (mit Ct-Werten zwischen 25.58 und 39.08) Banden bei 600-700 bp zeigten, konnten nur 4 durch Sequenzierung bestätigt werden, da auch eine *glpQ* PCR keine positiven Ergebnisse erbrachte.

Die Sequenzierung von 8 *p41* Real-Time PCR Produkten ergab Sequenzen, die eine Infektion mit *B. miyamotoi* bestätigten (vgl. Abbildung IV.3.10).

Eine Zecke ("EG-321") erwies sich als koinfiziert mit einem Ct-Wert von 38.22 im Cy5-Kanal und 33.84 im FAM-Kanal(vgl. Tabelle IV.3.11).
Die Prävalenz von *B. miyamotoi* im Jahr 2011 beträgt demzufolge 2,5%. Im April betrug die Prävalenz 1,8% und blieb im Frühling und Sommer konstant bei 2,9% bis 4,8%. Im Oktober und November stieg der Wert auf 11,1% an, während im November keine und im Dezember eine Infektion mit *B. miyamotoi* nachgewiesen werden konnte (vgl. Tabelle IV.3.9).

IV.3.e Zecken aus dem Englischen Garten, Grafrath und Oberschleißheim 2012

Von den insgesamt 345 Zecken aus dem Englischen Garten 2012 hatten 45 ein positives Ergebnis mit Ct-Werten zwischen 28.71 und 39.99. Die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. beträgt im Jahr 2012 13%. Am häufigsten kamen *B. burgdorferi* s.l.-infizierte Zecken im Juni mit 52,1% und im August mit 25% vor (vgl. Tabelle IV.3.12).
Aus dem Englischen Garten 2012 waren 8 Zecken positiv für *B. miyamotoi* in der Duplex PCR mit Ct-Werten von 22.28 bis 36.41im Cy5-Kanal. Die Prävalenz von *B. miyamotoi* beträgt somit im Jahr 2012 im Englischen Garten 2,3%. Im Frühling und Sommer wurden in allen Monaten, mit Ausnahme von Juni mit 6,2%, ähnliche Prävalenzen von 0% im Juli und August bis 2% im Mai und 1,1% im April errechnet (vgl. Tabelle IV.3.12).
Zwei Proben erwiesen sich mit den Ct-Werten im FAM-Kanal von 40.74 und 32.94 als koinfiziert mit *B. burgdorferi* s.l.. Eine ("EG-1235") wurde folglich mit einer *clpA* MLST PCR untersucht und zeigte nach der Gelelektrophorese eine leichte Bande bei 550 bp auf. Eine Wiederholung war negativ. Die Probe wurde gemeinsam mit der zweiten koinfizierten Zecke ("EG-1026") mit einer *glpQ* PCR gescreent, die jedoch für beide Proben negativ war.
Die restlichen sechs Proben aus 2012 wurden mit einer *recG* nested MLST PCR untersucht. Nur drei hatten nach dem ersten Durchlauf positive Banden mit 600-700 bp. Von einer Probe ("EG-1228") wurde das Produkt der erneut durchgeführten *p41* Simplex Real Time PCR sequenziert (siehe Abbildung IV.3.10 und Tabelle IV.3.13). Die Sequenzierung bestätigte eine Infektion mit der europäischen *B. miyamotoi*.
Im April 2012 wurden in Grafrath 331 Zecken geflaggt, wovon44 positiv waren; 32 für *B. burgdorferi* s.l. und 12 für *B. miyamotoi*. Dies ergibt eine Prävalenz von 9,7% für *B. burgdorferi* s.l. und 3,6% für *B. miyamotoi* (vgl. Tabele IV.3.14). Die Ct-Werte in FAM

lagen zwischen 29.00 von 39.96. In der *p41* Duplex Real-Time PCR erwiesen sich 9 Proben mit den Ct-Werten zwischen 26.56 und 39.12 positiv für *B. miyamotoi*, da drei Proben nicht mehr auffindbar waren, sodass diese nicht weiter untersucht wurden. Die Prävalenz für *B. miyamotoi* beträgt somit 2,7%. Zwei Proben erwiesen sich als koinfiziert mit *B. burgdorferi* s.l. und zeigten Ct-Werte im FAM-Kanal von 29.39 und 37.48. Eine koinfizierte Probe ("G-992") wurde mit einer *glpQ* PCR erfolglos untersucht. Die andere koinfizierte Probe ("G-888") wurde mit den anderen vier Proben gemeinsam mithilfe einer *recG* nested MLST PCR überprüft. Drei Proben wiesen nach der Gelelektrophore positive Banden bei 600-700 bp auf und wurden mit der Sequenzierung bestätigt. Mit nur einer, zuvor *recG*-negativen Probe ("EG-814") wurde versuchsweise eine *glpQ* PCR wiederholt, die sich als positiv herausstellte. Durch anschließende Sequenzierung wurde diese bestätigt (vgl. Tabelle IV.3.15).

Aus Oberschleißheim wurden 60 Zecken verwendet. Aus März 2012 erwiesen sich alle Proben als negativ. Im Mai 2012 waren von den 58 gescreenten Zecken 7 positiv für *B. burgdorferi* s.l., was eine Prävalenz von 12,1% ergibt. Für *B. miyamotoi* ergab sich eine Prävalenz von 0% (vgl. Tabelle IV.3.16).

Die Ct-Werte der 7 positiven Proben lagen zwischen 35.84 und 39.52. Die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. betrug somit im Jahr 2012 in Oberschleißheim 11,7%.

Beprobungsort, Jahr	**Anzahl gesammelter Zecken**	**FAM Positive**	**Cy5 Positive**	***B. burgdorferi* s.l. [%]**	***B. miyamotoi* [%]**
Siebengebirge, 2012	335	31	13 (6)*	9,3	3,9 (1,8)*
Siebengebirge, 2013	834	60	21 (13)*	7,2	2,5 (1,6)*
Siebengebirge, 2014	264	22	8 (3)*	8,3	3 (1,1)*
Englischer Garten, 2011	483	72	12 (12)*	14,9	2,5 (2,5)*
Englischer Garten, 2012	345	45	8 (4)*	13,0	2,3 (1,2)*
Grafrath, 2012	331	32	9 (4)*	9,7	2,7 (1,2)*
Oberschleißheim, 2012	60	7	0	11,7	0

Tabelle IV.3.17: Zusammenfassende Darstellung der Anzahl und Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* aus dem Siebengebirge 2012, 2013 und 2014, Englischen Garten 2011, 2012, Grafrath 2012 und Oberschleißheim 2012.*Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die *B. miyamotoi* positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten.

IV.4. PCR Sensitivitätstest von *glpQ*, *recG* und *clpA*

Die Verdünnungsreihe mit den Genomäquivalenzen 10^{-1} bis 10^{4} zeigte in der *glpQ* PCR eine positive Bande bei der Genomäquivalenz 10^{4} mit ca. 700-800 bp.
Die Verdünnungsreihe in der *recG* PCR zeigte zwei positive Banden bei den Genomäquivalenzen 10^{4} und 10^{3} mit ca. 700 bp, während die restlichen Banden nur sehr ungenau und verschoben waren.
Die Verdünnungsreihe in der *clpA* PCR zeigte schließlich zwei untereinander liegende Banden nur bei der Genomäquivalenz 10^{4} bei ca. 850 bp.

IV.5. *hbb*-Schmelzkurvenanalyse

IV.5.a Schmelzkurvenanalyse der Koinfektionen aus dem Englischen Garten 2010/2012

Mithilfe des *hbb* Gens sollten vier Proben aus dem Jahr 2012 aus dem Englischen Garten versuchsweise nach den Spezies aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex untersucht werden. Zwei Proben waren *B.burgdorferi* s.l.-positiv und eine war mit *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* koinfiziert. Zusätzlich sollten 14 koinfizierte Stichproben aus dem Jahr 2010 aus dem Englischen Garten auf eine mögliche Infektion untersucht werden.
Die koinfizierten Proben lieferten zuvor in der *glpQ* oder *clpA* PCR keine Ergebnisse.
Als Positivproben wurden 8 Stämme aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex mit ihren bekannten Schmelztemperaturen zur Orientierung verwendet (vgl. Tabelle IV.5.1 und Tabelle III.4.1).

Kontrollstamm	**Schmelztemperatur [°C]**
PHei (*B.garinii* OspA 5)	53,34
PBr (*B.garinii* OspA 3)	58,90 / 68,22
PFin (*B.bavariensis*)	53,34
PGau (*B.afzelii*)	67,28
Poti (*B.lusitaniae*)	63,73 / 69,02
VS116 (*B.valaisiana*)	61,37
PKa2 (*B.burgdorferi* s.s.)	70,42
PSig (*B.spielmanii*)	61,22

Tabelle IV.5.1: In der *hbb* Schmelzkurvenanalyse verwendete acht angezüchtete Kontrollstämme aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex aus dem NRZ Borrelien Labor. Diese wurden als orientierende Positivproben verwendet und die Schmelztemperaturen mit den vier Zecken-Proben aus dem Englischen Garten 2012 und den 14 koinfizierten Proben aus dem Englischen Garten 2010 verglichen.

Zur Auswertung wurden die Kurven im Programm LC 480 übereinander gelegt und die Zeckenproben mit den Kontrollstämmen verglichen. Insgesamt wurden zwei Proben gefunden, die möglicherweise mit *B. bavariensis*(vgl. PFin) oder *B. garinii* OspA 5 (vgl. PHei) infiziert waren. Diese beiden Stämme sind aufgrund sehr ähnlicher Schmelztemperaturen kaum zu unterscheiden. Die Schmelztemperatur der Probe "EG-85" lag mit 53,34 °C sehr nahe an denWerten der Kontrollstämme (AbbildungIV.5.2).

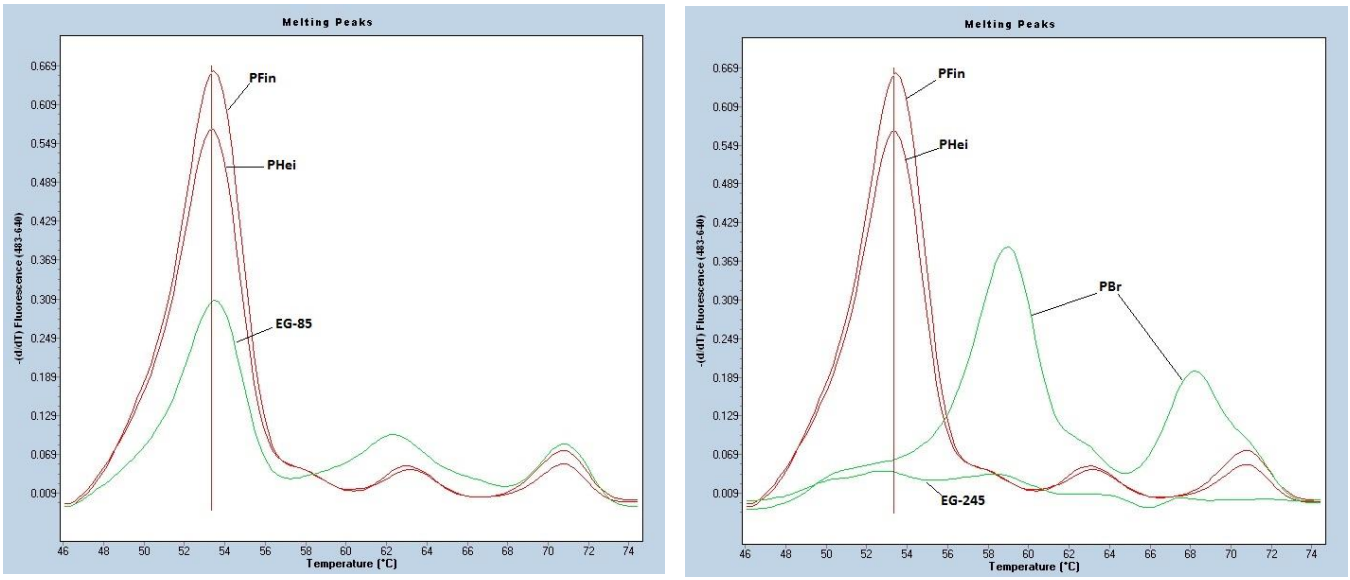


Abbildung IV.5.2: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-85" (links) und "EG-245" (rechts), verglichen mit den Schmelzkurven der Positivkontrollen *B. bavariensis* (PFin), *B. garinii* OspA 5 (PHei), sowie *B. garinii* OspA 3 (PBr). Die Schmelztemperaturen dieser Kontrollstämme waren denen der Zecken-Proben am ähnlichsten. Diese lagen bei 53,34°C für "PFin" und "PHei", außerdem bei 58,90°C und 68,22°C für "PBr".

Die Probe "EG-245" hingegen war nur schlecht identifizierbar. Mit einer Schmelztemperatur von 52,96°C ähnelte sie den Stämmen *B. bavariensis* (vgl. PFin) und *B. garinii* OspA 5(vgl. PHei), zeigte aber zusätzlich leichte Anhebungen bei den Temperaturen 58,60°C und 67,41°C, ähnlich der *B. garinii* OspA 3 (vgl. PBr) (Abbildung IV.5.2).

In einer Zecke ("EG-309") wurde *B. garinii* OspA 3 (vgl. PBr) nachgewiesen. Die erste Schmelztemperatur von 58,59°C war mit dem ersten Wert der Positivprobe (58,90°C) vergleichbar, während der zweite mit 66,60°C vom zweiten Wert (68,22°C) etwas abwich (Abbildung IV.5.3). Insgesamt wurden in fünf Zecken *B. burgdorferi* s.s. (vgl. PKa2) nachgewiesen. Auch hier waren die Schmelztemperaturen (zwischen 70,42°C und 70,72°C) mit der Temperatur der Positivprobe vergleichbar (vgl. Tabelle IV.5.6). Außer bei der Probe "EG-272" zeigten vier Kurven eine Anhebung bei einer Schmelztemperatur von ca. 50,34°C. Dieser unbekannte Wert wich von den Temperaturen der Positivproben ab (Abbildungen IV.5.3 (rechts) und IV.5.4 (links)).

Die Probe "EG-285" besaß neben den Schmelztemperaturen 70,52°C und 61,40°C, wie die oben genannten Proben, eine zusätzliche Schmelztemperatur von 50,35°C (Abbildung IV.5.4). Dieser Wert ist erneut keiner bekannten Spezies, die als Referenz mitgelaufen war, zuordenbar. Mit den anderen beiden Werten ist auf eine Infektion

entweder mit *B. valaisiana* (vgl. VS116) oder mit *B. spielmanii* (vgl. PSig) zu schließen.

Insgesamt lassen die Schmelztemperaturen von 66,98°C bis 67,22°C von drei Proben auf eine Infektion mit *B. afzelii* (vgl. PGau) schließen. Zusätzlich wies die Probe "EG-23" zwei Schmelztemperatur von 53,31°C auf, die eine Infektion mit *B. garinii* OspA 5 (vgl. PHei) oder *B. bavariensis* (vgl. PFin) vermuten lässt und 66,98°C ähnlich der *B. afzelii* (vgl. PGau). Die Kurve der Probe "EG-105" lässt eine Verunreinigung vermuten. (Abbildung IV.5.5)

Alle Schmelztemperaturen und die jeweilige Stammzuordnung der untersuchten Zecken-Proben aus dem Englischen Garten 2012 und 2010 sind zusätzlich in Tabelle IV.5.6 aufgelistet.

IV.5.b *hbb*-Schmelzkurvenanalyse der drei *B. miyamotoi* Stämme

Aufgrund der Untersuchung vermeintlicher Koinfektionen wurde bei den oben genannten, bislang unbekannten Schmelztemperaturen zwischen 50,34°C und 50,35°C, trotz umstrittener Reaktionsfähigkeit der Spezies in der *hbb*-Schmelzkurvenanalyse, von *B. miyamotoi* ausgegangen.

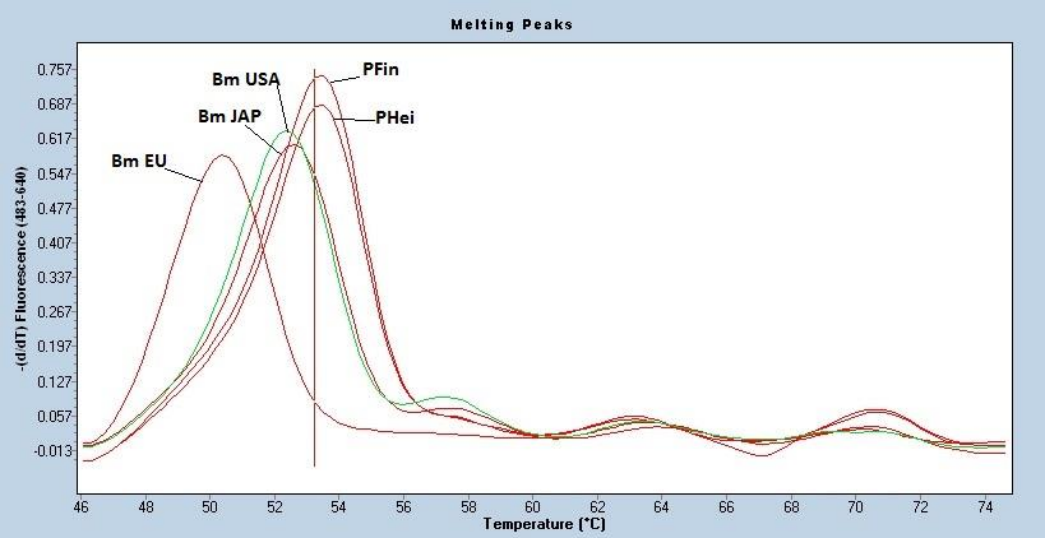


Abbildung IV.5.7: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse mit den drei *B. miyamotoi* Stämmen aus Europa, Japan und USA.Die Schmelztemperaturen wichen von denen der Positivproben *B. garinii* OspA 5 (PHei) und *B. bavariensis* (PFin) ab. In diesem Versuch lieferten die *B. burgdorferi* s.l. Kontrollstämme eine Schmelztemperatur von 53,25°C. Die *B. miyamotoi* Stämme USA und Japan hatten ähnliche Schmelztemperaturen bei 52,24°C und 52,46°C; beim europäischen Stamm betrug die Schmelztemperatur 50,36°C.

Zur Kontrolle wurde erneut eine *hbb* PCR angesetzt und die drei *B. miyamotoi* Stämme aus Europa, USA und Asien gleichzeitig mit denselben acht Positivstämmen untersucht. Tatsächlich lieferten alle drei Proben ein positives Ergebnis, die auch von der am nächsten liegenden Schmelztemperatur der Positivproben PFin und PHei (53,25°C) abwichen. Während *B. miyamotoi* USA und *B. miyamotoi* Japan ähnliche Schmelztemperaturen von 52,24°C und 52,46°C hatten, besaß *B. miyamotoi* Europa eine Schmelztemperatur von 50,36°C(Abbildung IV.5.7).

IV.6. *p41* Real-Time PCR an Patientenproben

Um herauszufinden, ob die hier entwickelte Real-Time PCR als zukünftige Screeningmethode für Patientenmaterial verwendet wergen könnte, wurde ein Versuch mit gespikten Patientenproben, hergestellt aus EDTA-Vollblut, Blutserum, Kniegelenkspunktat und Liquor, durchgeführt. Die gelisteten "Patientenproben" wurden in einer Verdünnungsreihe mit den Genomäquivalenzen 10^{-1} bis 10^{4} von kultivierten *B. miyamotoi* vermischt, extrahiert und mit einer Verdünnungsreihe aus PBS-Puffer und einer *B. miyamotoi* DNA als Positivprobe verglichen. Eine DNA-Extraktion erfolgte auch mit reinen "Patientenproben" ohne Borrelien, die ebenfalls in der *p41* Simplex Real Time PCR gescreent wurden. Diese sollten als Negativproben dienen.
Bei den Versuchen mit künstlichen Patientenproben kam es bei keiner Probe zu einer Änderung der Sensitivität der *p41* Real-Time PCR. In Tabelle IV.6.1 ist als Beispiel die Verdünnungsreihe mit EDTA-Vollblut dargestellt. Im Vergleich zur Verdünnungsreihe mit reiner Borrelien-DNA und Borrelien-Zecken-DNA waren die Ergebnisse ähnlich. So lagen die Ct-Werte bei einer Genomäquivalenz von 10^{-1} im Cy5-Kanal zwischen 35.48 in Liquor und 36.92 in Blutserum; bei der Genomäquivalenz von 10^{0} zwischen 31.95 in Blutserum und 34.24 in PBS-Pufferund schließlich bei einer Genomäquivalenz von 10^{4} zwischen 19.03 in EDTA-Vollblut und 20.49 in Kniegelenkspunktat (vgl. Tabellen IV.6.1-IV.6.9). Wie in den oben genannten Verdünnungsreihen sanken bzw. stiegen die Ct-Werte mit zunehmender bzw. sinkender Genomäquivalenz auch in den Versuchen mit menschlicher DNA. Auch hier schien das Vorhandensein von menschlicher DNA die Sensitivität der *p41* Real-Time PCR nicht zu beeinflussen. Die Ct-Werte waren jedoch in diesen Verdünnungsreihen, verglichen mit den Versuchen mit reiner Borrelien-DNA und Zecken-DNA, um eine log-Stufe niedriger, was vermuten

lässt, dass in der *B. miyamotoi*-Kultur eine unbestimmte Menge an abgestorbenem Borrelienmaterial vorhanden war und dies die Genomäquivalenz erhöhte.

Verdünnungen	**Ct-Wert [Cy5] EDTA-Vollblut**	**Ct-Werte [Cy5] Borrelien-DNA**	**Ct-Werte [Cy5] Borrelien/Zecken-DNA**
10^{-1}	36.83	No Ct	No Ct
10^{0}	33.60	No Ct	No Ct
10^{1}	30.05	37.14	37.07
10^{2}	25.56	32.75	33.34
10^{3}	22.43	29.06	29.81
10^{4}	19.03	25.88	27.27

Tabelle IV.6.1: *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell**;** Verdünnungsreihe mit EDTA-Vollblut im Vergleich zu den Verdünnungsreihen mit Borrelien-DNA aus Kultur und Borrelien-Zecken-DNA. Das Vorhandensein fremder DNA scheint die Sensitivität der *p41* Sonde nicht zu stören. Die Ct-Werte in der Verdünnungsreihe mit EDTA-Vollblut sind jeweils um eine log-Stufe niedriger, da in der *B. miyamotoi* Kultur eine unbestimmte Menge an abgestorbenem DNA-Material vorhanden war und dies die Genomäquivalenz erhöhte.

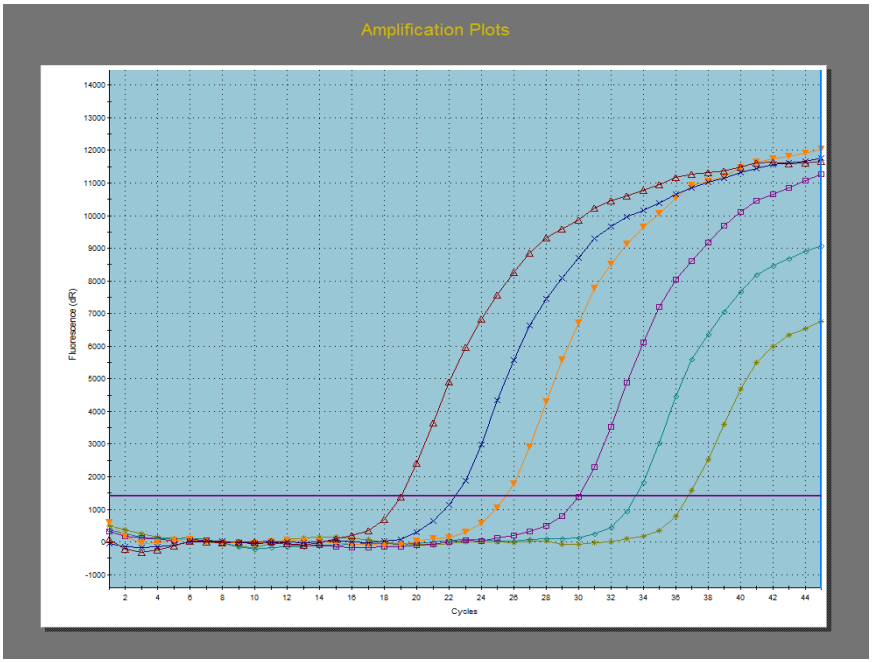


Abbildung IV.6.2: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.Verdünnungsreihe mit EDTA-Vollblut.

V. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung und Validierung einer neuen sensitiven Real-Time PCR beschrieben, die einen schnellen und simultanen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* ermöglicht.

Zur Identifikation von *B. miyamotoi*, einer Rückfallfieberspirochäte, die von Schildzecken der Gattung *Ixodes* in den temperierten Zonen der nordöstlichen Hemisphere übertragen wird, wurden bislang häufig beispielsweise 16S rRNA nested PCR (Richter et al., 2003), *glpQ* qPCR (Ullmann, Gabitzsch, Schulze, Zeidner, & Piesman, 2005), 16S RNA Pan-Rückfallfieberborrelien qPCR, Dunkelfeldmikroskopie, gezielte*fla* qPCR (Hovius et al., 2013) und quantitative Real-Time PCR des *p66* Gens (Cosson et al., 2014) verwendet, die teilweise aus mehreren Ansätzen bestehen und keinen sicheren Nachweis von *B. miyamotoi* garantieren. Es liegt auf der Hand, dass die genannten Methoden bei der Untersuchung von Zeckenund Patientenproben auch mehr Zeit und Arbeit in Anspruch nehmen. Zusätzlich ist eine nested PCR anfälliger für Kontaminationen.

V.1. Entwicklung und Validierung der *p41* Duplex Real-Time PCR

In unserer Studie konnte erfolgreich eine Duplex Real-Time PCR getestet werden, die eine Unterscheidung zwischen *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* mit nur einem Ansatz simultan ermöglicht. Diese Methode kann, wie oben beschrieben, als routinediagnostisches Mittel leicht und schnell zur Untersuchung von Umwelt-/ oder klinischen Proben verwendet werden.

Zunächst wurden drei eigens für *B. miyamotoi* entwickelte *p41* Sonden als Simplex Real-Time PCR getestet, wobei sich "Sonde2" mit nur jeweils einem hohen Ct-Wert bei *B. bissettiae* und *B. parkeri* als die spezifischste erwies (vgl. Tabelle IV.1.1). *B. bissettiae* gehört in Europa zu den selteneren Genospezies aus dem *B.burgdorferi* s.l. Komplex (Coipan et al., 2016) und ist humanpathogen, wurde aber selten in Patienten gefunden (Margos et al., 2016). *B. parkeri* wird hingegen hauptsächlich von *Ornithodorus*-Zecken in Nordamerika übertragen (Dworkin, Schwan, Anderson, & Borchardt, 2008), weshalb diese nur grenzwertig positiven Werte vernachlässigbar sind.

B. miyamotoi zeigt eine ähnliche Verbreitung wie *B. burgdorferi* s.l. und kommt in den gleichen Vektoren vor: I. *ricinus*, I. *scapularis*, I. *pacificus* und I. *persulcatus* (Anderson, 1990; Eisen & Lane, 2002). *B. miyamotoi* formt drei Populationen: eine europäische, eine nordamerikanische und eine asiatische, die sich untereinander genetisch leicht unterscheiden (Crowder et al., 2014). Diese Populationen wurden bei der Sondenentwicklung berücksichtigt, indem eine Sequenz von einem Stamm aus jeder Population beim Primer- und Sondendesign einbezogen wurde. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb alle Primer und Sonden mit allen Untergruppen aus den drei Regionen gleich gut reagieren.

Anschließend wurde "Sonde 2" mit der *p41* Sonde für *B. burgdorferi* s.l. "FlaProbe1" im Duplex PCR-Verfahren angewendet.Die Sonden wurden an denselben 12 Stämmen aus dem *B. burgdorferi* s.l. (6) und Rückfallfieberkomplex (6) getestet sowie an Stämmen der drei *B. miyamotoi* Populationen Nordamerika, Europa und Asien. Im Gegensatz zur zunächst durchgeführten Simplex Real-Time PCR mit "Sonde2" ergab nun *B. bissettiae* in der Duplex PCR ein negatives Ergebnis. Während die meisten *B. burgdorferi* s.l. Stämme, wie erwartet, positive Werte ergaben, blieben *B. lusitaniae* und *B. japonica*, beide *B. burgdorferi* s.l. Stämme, negativ (vgl. Tabelle IV.1.1). Eine Ursache für die negativen Ergebnisse dieser beiden Genospezies konnte aufgrund des Fehlens von ausreichend langen *fla*-Referenz-Gensequenzen dieser beiden Spezies nicht gefunden werden. Theoretischwäre es möglich, dass Differenzen in der Primer- oder Sondensequenz die Bindung unter den gegebenen Konditionen verhindert haben. Diese beiden Spezies spielen jedoch eine humanpathogenetisch untergeordnete Rolle unter dieser Erregergruppe (Collares-Pereira et al., 2004) und kommen nur in bestimmten geographischen Regionen vor. So wurde *B. lusitaniae* bislang hauptsächlich in mediterranen Gebieten Europas (Amore et al., 2007; Collares-Pereira et al., 2004; De Michelis et al., 2000) und Afrikas (Sarih, Jouda, Gern, & Postic, 2003; Younsi et al., 2005), aber nur selten in Mittel- und Nordeuropa (Schwarz et al., 2012) nachgewiesen. *B. japonica*wurde bisher nur in Japan nachgewiesen (Masuzawa, 2004). Trotzdem wäre es sinnvoll, diesbezüglich weitere Untersuchungen durchzuführen, da bei genaueren epidemiologischen Studien auch diese beiden Speziesberücksichtigt werden sollten.

Die Rückfallfieberborrelien *B. hermsii* und *B. parkeri* ergaben einen positiven Wert im Kanal der *B. burgdorferi* s.l. Sonde, wobei *B. parkeri* mit dem sehr hohen Ct-Wert von 41.35 als negativ gewertet werden kann.

Die Versuche zeigten in der Duplex Real-Time PCR keine gegenseitige Beeinflussung der beiden Sonden, auch nicht bei der Simplex Real-Time PCR mit gemischten Proben aus *B. miyamotoi* und einer Lyme-Borrelienspezies (vgl. Tabellen IV.1.1 und IV.1.2). Die Ct-Werte blieben mit jedem Versuch vergleichbar und wiesen keine großen Schwankungen auf. Abweichungen der Ct-Werte ergaben sich aus den unterschiedlichen Konzentrationen der verwendeten Proben. Dies konnte mit einer Verdünnungsreihe aus DNA von *in vitro* angezüchteten Lyme-Borrelien und *B. miyamotoi*, reziprok gemischt, d.h. mit gegenläufiger Konzentration verdeutlicht werden. Je höher die Genomäquivalenz, desto niedriger ist der Ct-Wert (vgl. Tabelle IV.2.2-IV.2.8). Mithilfe der Verdünnungsreihe konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl der Nachweis von *B. miyamotoi* als auch von *B. burgdorferi* s.l. bereits bei einer Genomäquivalenz von 10^0-10^1 möglich ist, jedoch waren bei der Genomäquivalenz von 10^0 nur drei von den insgesamt elf Proben positiv. Beide Sonden sind somit ähnlich sensitiv für *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* und verloren auch bei einer Wiederholung mit Zecken-DNA, die als Kontrolle für einen inhibitorischen Einfluss von Zecken-DNA eingesetzt wurde, nichts an ihrer Sensitivität (vgl. Tabellen IV.2.9-IV.2.15).

Zur Kontrolle, dass mit der positiven *p41* Duplex Real-Time PCR tatsächlich *B. miyamotoi* nachgewiesen wird, wurde als Bestätigungs-PCR mit anschließender Sequenzierung noch eine weitere PCR Reaktion mit einemder acht houskeeping Gene (z.B. *recG, clpA*), *glpQ* oder dem Flagellin Gen (*flaB*) durchgeführt. Da häufig die konventionelle PCR weniger sensitiv war als die Real-Time PCR, ließen sich in manchen Fällen die Infektionen nicht bestätigen. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da bei der Real-Time PCR kürzere DNA-Fragmente als bei der konventionellen PCR amplifiziert werden und damit eher mit einer positiven Reaktion zu rechnen ist. Diese Hypothese wurde mittels der angefertigten Verdünnungsreihen überprüft und es zeigte sich, dass eine positive Probe in der *glpQ* PCR erst ab einer Genomäquivalenz von 10^4 und in der *recG* nested MLST PCR ab 10^2-10^3 nachweisbar war. Deshalb wurden zur Bestätigung von einigen Proben die Produkte aus der *p41* Simplex Real-Time PCR sequenziert. Obwohl die in der Real-Time PCR amplifizierten DNA-Fragmente deutlich kürzer sind und sich deshalb weniger gut zur Sequenzbestimmung eignen, konnte damit gezeigt werden, dass es sich bei dem Amplifikationsprodukt um eine Borrelien DNA handelt.

Zusätzlich wurde mittels *hbb*-Schmelzpunktanalyse ein Versuch mit Stämmen der drei *B. miyamotoi* Populationen (USA, Europa, Asien) durchgeführt. Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Scholz et al., 2013) stellte sich heraus, dass alle Stämmedetektiert werden konnten. Während *B. miyamotoi* USA und *B. miyamotoi* Japan ähnliche Schmelztemperaturen von 52,24°C und 52,46 °C hatten, wurde *B. miyamotoi* Europa bei einer Schmelztemperatur von 50,36°C nachgewiesen. Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten in weiteren Untersuchungen weiterentwickelt werden, um die Sensitivität der Real-Time *hbb* PCR zu verbessern. Dann könnte auch diese Methode ein aussichtsreiches, zukünftiges Diagnostikmittel darstellen.

V.2. *B. miyamotoi* als neuer Forschungsfokus

Lange wurde *B. miyamotoi* keine Beachtung geschenkt, da sie nicht als humanpathogen galt. Im Oktober 2011 wurden in Russland die ersten symptomatischen Fälle einer Infektion mit *B. miyamotoi* dokumentiert (Platonov et al., 2011). Seitdem die Humanpathogenität bekannt ist, wurden jährlich deutlich mehr Studien veröffentlicht:In PubMed.gov sind seit der Entdeckung der Spezies 1995 bis 2011 lediglich 34 Publikationen zu finden, die *B. miyamotoi* erwähnen. Seit 2011 sind mindestens 127 (Stand: 15.01.2017) neue Studien veröffentlicht worden. Zahlreiche Publikationen beschäftigen sich mit der Prävalenz von *B. miyamotoi* in den heimischen Vektoren. Diese variiert deutlich in den verschiedenen *Ixodes* Spezies, aber auch regional innerhalbderselben Vektorspezies. Zudem beschreiben ungefähr 20 Artikel die Humanpathogenität von *B. miyamotoi*. In Europa wurden bisher vier klinische Fälle mit *B. miyamotoi* publiziert. Bei den Patienten handelte es sich oft um immunsupprimierte Personen. Zum Beispiel wurden in einer kürzlich veröffentlichten Publikation berichtet, dass eine Patientin nach chemotherapeutischer Behandlung eines non-Hodgkin Lymphoms nach zwei Zeckenstichen in Norddeutschland eine *B. miyamotoi*-assoziierte Neuroborreliose entwickelte. Als klinische Symptome zeigten sich Schwindel, Erbrechen, Kopfschmerzen sowie eine leichte Nackensteifigkeit seit einigen Tagen. Eine Lumbalpunktion lieferte keinen Hinweis auf eine virale oder lymphom-assoziierte Genese, während eine Untersuchung auf *B. miyamotoi* mittels einer 16S rRNA PCR positiv war (Boden, Lobenstein, Hermann, Margos, & Fingerle, 2016). In Anbetracht dessen wird der Einsatz einer schnellen und simultanen Nachweismethode von *B.*

miyamotoi und *B. burgdorferi* s.l. mithilfe der *p41* Duplex Real-Time PCR sowohl in der Epidemiologie als auch in der Klinik stetig bedeutsamer.

V.3. Validierung der *p41* Duplex Real-Time PCR anhand einer Feldstudie

Die Validierung der neu entwickelten *p41* Duplex Real-Time PCR wurde anschließend in einer Feldstudie fortgesetzt. Es wurden insgesamt 2.652 Zecken-Proben aus dem Siebengebirge, dem Englischen Garten/München, Grafrath und Oberschleißheim untersucht.

Die Verteilung der Spezieskomplexe änderte sich im Siebengebirge von 2012 bis 2014 nur wenig. Während die Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. von 2012 bis 2013 um 2,1% gesunken ist, blieb die Infektionsrate von 2013 bis 2014 mit einem Unterschied von 1,1% ähnlich. Auch die Prävalenz von *B. miyamotoi* änderte sich in dieser Region kaum in diesen Jahren. Von 2012 bis 2013 sank die Infektionsrate um 1,4% und stieg von 2013 bis 2014 wieder um 0,5% an. Es gab nur eine Koinfektionen im Jahr 2012.

Im Jahre 2013 scheint die geringste Vorkommenszahl mit 7,2% für *B. burgdorferi* s.l. und 2,5% für *B. miyamotoi* vorzuliegen. Die Verteilung der *B. burgdorferi* s.l. Spezies im Jahr 2013 ergab, dass die am häufigsten vertretenen Stämme *B. afzelii* (25%) und *B. garinii* (28,3%) waren, was gut zu bisher publizierten Ergebnissen passt (Rauter & Hartung, 2005). Zum Vergleich waren im Jahr 2007 ebenfalls *B. garinii* (58,6%) und *B. afzelii* (56,4%) die häufigsten Spezies im Siebengebirge. Die Infektionsrate war bei beiden um etwa 30% höher als im Jahr 2013 (Schwarz et al., 2012). Verglichen mit Ergebnissen aus Bayern 2008 waren auch hier *B. garinii* (34,3%) und *B. afzelii* (25,1%) die häufigsten Spezies (Fingerle et al., 2008). Alle Stämme sind abhängig von ihren Wirtspopulationen, z.B. Vögel für *B. garinii* und *B. valaisiana* bzw. kleine Nagetiere oder Eichhörnchen für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. (Kurtenbach et al., 1998; Kurtenbach et al., 2002; Taylor et al., 2013).

Werden die Infektionsraten von *B. burgdorferi* s.l. untereinander verglichen, so ist die Prävalenz im Süden Deutschlands etwas höher als im Nordwesten. Im Jahr 2012 unterschieden sich die Prävalenzen aus dem Englischen Garten und Oberschleißheim um 1,3% und aus dem Englischen Garten und Grafrath um 3,3%. Trotzdem sollte bedacht werden, dass vor allem aus Oberschleißheim nur eine sehr kleine Anzahl an Zecken (60) gescreent wurde, weshalb an diesem Beprobungsort vermutlich auch keine *B. miyamotoi* nachgewiesen wurde. Die Prävalenzen aus Bayern 2011 bis 2012 waren

mit älteren Daten vergleichbar. 2008 betrug die Gesamtinfektionsrate 22%. Ledigilich die Prävalenz aus dem Englischen Garten 2008 war mit 37,2% um ungefähr 20% höher als 2011 und 2012, während sich die Durchseuchungsrate in Grafrath 2008 mit 12,3% nur um ca. 3% unterschied (Fingerle et al., 2008).

Im Siebengebirge hingegen sind die Prävalenzen von 2012 bis 2014 insgesamt kleiner als in Bayern. In beiden Regionen waren die Infektionsraten mit *B. burgdorferi* s.l. höher als mit *B. miyamotoi*. Im Gegensatz zu den Prävalenzen von *B. burgdorferi* s.l. wiesen die Infektionsraten von *B. miyamotoi* jedoch nur geringe regionale und zeitliche Unterschiede auf. Die Werte lagen im Jahr 2012 sowohl in Bayern als auch in Nordrhein-Westfalen zwischen 2,3% im Englischen Garten, 2,7% in Grafrath und 3,9% im Siebengebirge. Interessant wäre noch zu erfahren, von welchem Vertebratenwirt die Prävalenz von *B. miyamotoi* in Deutschland abhängig ist, da die Anzucht *in vitro* bislang nur mit 50% Humanserum möglich ist (Margos et al., 2014). Bislang wurden *B. miyamotoi* infizierte Zecken aus amerikanischen Rotkardinalen, *Cardinalis cardinalis* (Hamer et al., 2012), kleinen Nagetieren ohne jahreszeitliche Unterschiede, sowohl in Nordamerika, als auch in der Schweizgewonnen (Burri, Schumann, Schumann, & Gern, 2014; Taylor et al., 2013). *B. miyamotoi* konnte in der Schweiz zudem auch in an Zugvögeln saugenden Zecken nachgewiesen werden (Lommano, Dvorak, Vallotton, Jenni, & Gern, 2014).

Verglichen mit anderen Studien, so aus dem Rheinland 2003, war der dortige Durchschnittswert von 3,5% (Richter et al., 2003) denen aus dem Siebengebirge und dem Englischen Garten sehr ähnlich.In anderen Gebieten Europas, so zum Beispiel in den Niederlanden, betrug die Infektionsrate 20143,6% (Fonville et al., 2014) und in Frankreich 3% (Cosson et al., 2014). In Estlandbetrug die Prävalenz von *B. miyamotoi* 2012 0,9%. In dieser Überlappungszone dieser beiden Vektoren war die Prävalenz in *I. persulcatus* (2,7%) höher als in *I. ricinus* (0,4%) (Geller et al., 2012). Diese Werte passen gut mit unseren Ergebnissen der *p41* Duplex Real-Time PCR zusammen. Diese neu entwickelte und validierte PCR scheint somit sehr gut die Verhältnisse in den getesteten Zecken darzustellen und könnte auch in Zukunft als Screeningmethode eingesetzt werden.

V.4. *p41* Duplex PCR als potentielles Instrument für Patientenscreening

Neben dem Screening von *Ixodes* Zecken wurden zusätzlich gespikte Patientenproben aus EDTA-Vollblut, humanem Serum, Liquor und Kniegelenkspunktat hergestellt, die mit *B. miyamotoi in vitro* vermengt wurden. Nach der DNA-Extraktion und anschließender *p41* Real-Time PCR war zu sehen, dass die erwähnte Methode auch bei der Anwendung einer Verdünnungsreihe mit künstlichen menschlichen Proben keine Änderung der Sensitivität aufwies (vgl. Tabelle IV.6.1). Bislang wurde eine Infektion mit *B. miyamotoi* beispielsweise mittels PCR mit gezieltem Nachweis der Flagellin- bzw. 16S rRNA-Gene und anschließender Sequenzierung, oder dem Nachweis von Anti-Borrelia IgM aus Patientenserum durchgeführt (Boden et al., 2016; Hovius et al., 2013; Platonov et al., 2011). Die Erreger aus dem Rückfallfieberkomplex vermehren sich im Patienten, im Gegensatz zu Lyme-Borrelien, hauptsächlich im Blut (Fukunaga et al., 1995) und lösen schubweise Fieber aus. Diese Schübe werden febrile und afebrile Phasen genannt. Vor und in der febrilen Phase sind die Erreger im Blut nachweisbar (Hahn, 2009). *B. miyamotoi* kann aus humanem Plasma zentrifugiert und angezüchtet werden. Dies funktioniert jedoch nicht mit Patientenproben, die mit Antikoagulantien wie EDTA, Citrat und Heparin versetzt worden sind, da diese das Borrelien-Wachstum hemmen (Koetsveld et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mithilfe der *p41* Real-Time PCR *B. miyamotoi* in allen gespikten Patientenproben, auch EDTA-Vollblut, gleichermaßen nachgewiesen werden.

Einige Infektionen mit *B. miyamotoi* könnten undetektiert bleiben, da die Symptomatik unspezifisch ist und leicht mit anderen Krankheitsbildern verwechselt werden kann. Dies kann nicht nur einen ungünstigen Effekt auf die Gesundheit der Patienten haben, sondern auch kostspielig und langwierig seinsowie eine medizinische Fehldiagnose begünstigen (Platonov et al., 2011). Außerdem sind Routinediagnostiktests von *B. burgdorferi* s.l. für den Nachweis von *B. miyamotoi* ungeeignet (Hovius et al., 2013). Somit könnte eine Infektion mit der Rückfallfieberspezies *B. miyamotoi* auch mittels Real-Time PCR zukünftig in Körperflüssigkeiten leichter diagnostiziert werden. Nichtsdestotrotz sollten diesbezüglich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

VI. Zusammenfassung

Angesichts der seit 2011 bekannten Humanpathogenität der *B. miyamotoi* und des sympatrischen Vorkommens dieser Spezies mit Vertretern des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes in *Ixodes* Zecken der gesamten nördlichen Hemisphäre, ist das Interesse für diese kürzlich beschriebene Spezies in den letzten Jahren gestiegen. Im Rahmen dieser Studie ist es uns gelungen, eine geeignete Diagnostik-Methode sowohl für epidemiologische Forschungen als auch für klinisch-diagnostische Zwecke zu entwickeln.

Es wurde eine schnelle, sensitive und spezifische *p41* Duplex Real-Time PCR validiert, durch die *B. burgdorferi* s.l. und *B. miyamotoi* sowohl in Umwelt- als auch zukünftig in Patientenproben simultan nachgewiesen werden können. Mit Hilfe des Flagellin-Gens (*fla*B; *p41*) können Spezies aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex routinemäßig diagnostiziert, sowie auch *B. miyamotoi* identifiziert werden.

Diese PCR kann sowohl als Simplex als auch als Duplex PCR verwendet werden, was mithilfe zweier fluoreszierender Sonden eine Unterscheidung der beiden Erregergruppen ermöglicht.

Sensitivität und Spezifität wurden an verschiedenen Kulturproben aus dem Rückfallfieber- und *B. burgdoferi* s.l.-Komplex getestet sowie an DNA von *B. miyamotoi*-Stämmen aus Asien, Europa und USA.

Zusätzlich wurde die Validierung fortgesetzt, indem mittels der Duplex Real-Time PCR die Prävalenz von *Borrelia* spp. aus 1433 Zecken aus dem Siebengebirge, 828 aus dem Englischen Garten, 331 aus Grafrath und 60 aus Oberschleißheim, gesammelt in den Jahren 2011 bis 2014, bestimmt wurde. Im Jahre 2012 ergaben sich für *B. burgdorferi* s.l. im Siebengebirge 9,3%, im Englischen Garten 13%, in Grafrath 9,7% und in Oberschleißheim 11,7%, während die Prävalenzen für *B. miyamotoi* über die Jahre und in allen Beprobungsgebieten ähnlich hoch war mit 2,3-3,9%. Die Verteilung der *B. burgdorferi* s.l. Spezies ergab, dass *B. afzelii* (25% im Jahre 2013) und *B. garinii* (28,3% im Jahre 2013) am häufigsten vertreten sind. Insgesamt war die Prävalenz in Süddeutschland etwas höher als im Nordwesten.

Außerdem wurde anhand gespikter Patientenproben eine mögliche, zukünftige Anwendung dieser Screeningmethode für den humanmedizinischen Bereich getestet.

VII. Literaturverzeichnis

Aguero-Rosenfeld, M. E., Wang, G., Schwartz, I., & Wormser, G. P. (2005). Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews, 18*(3), 484-509.

Alekseev, A. N., Dubinina, H. V., & Jushkova, O. V. (2004). First report on the coexistence and compatibility of seven tickborne pathogens in unfed adult Ixodes persulcatus Schulze (Acarina: Ixodidae). *International Journal of Medical Microbiology Supplements, 293*, 104-108.

Amore, G., Tomassone, L., Grego, E., Ragagli, C., Bertolotti, L., Nebbia, P., Mannelli, A. (2007). Borrelia lusitaniae in immature Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) feeding on common wall lizards in Tuscany, central Italy. *J Med Entomol, 44*(2), 303-307.

Anderson, J. (1990). Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum, 77*, 23-34.

Armstrong, P., Rich, S., Smith, R., Hartl, D., Spielman, A., & Telford, S. (1996). A new Borrelia infecting Lone Star ticks. *The Lancet, 347*(8993), 67-68.

Assous, M., Postic, D., Paul, G., Nevot, P., & Baranton, G. (1993). Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of theBorrelia strains used as antigens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 12*(4), 261-268.

Assous, M. V.& Wilamowski, A. (2009). Relapsing fever borreliosis in Eurasia--forgotten, but certainly not gone! *Clin Microbiol Infect, 15*(5), 407-414.

Bacon, R. M., Pilgard, M. A., Johnson, B. J., Raffel, S. J., & Schwan, T. G. (2004). Glycerophosphodiester phosphodiesterase gene (glpQ) of Borrelia lonestari identified as a target for differentiating Borrelia species associated with hard ticks (Acari: Ixodidae). *J Clin Microbiol, 42*(5), 2326-2328.

Baltazard, M. (1954). Classification of Spirochaeta recurrentis. *Ann Parasitol Hum Comp, 29*(1-2), 12-32.

Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.-C., Assous, M., & Grimont, P. A. (1992). Delineation of Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International journal of systematic bacteriology, 42*(3), 378-383.

Barbour, A. (2002). Antigenic variation by relapsing fever Borrelia species and other bacterial pathogens. *Mobile DNA II. ASM Press, Washington, DC*, 972-994.

Barbour, A. (2004). *Specificity of Borrelia-tick vector relationships.* Paper presented at the Symposia-Society for General Microbiology.

Barbour, A. G. (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *The Yale journal of biology and medicine, 57*(4), 521.

Barbour, A. G. (2005). Relapsing fever. *Tick-borne diseases of humans. ASM Press, Washington, DC*, 268-291.

Barbour, A. G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A. G., Diuk-Wasser, M. A., Fish, D.& Tsao, J. I. (2009). Niche partitioning of Borrelia burgdorferi and Borrelia miyamotoi in the same tick vector and mammalian reservoir species. *Am J Trop Med Hyg, 81*(6), 1120-1131.

Barbour, A. G.& Hayes, S. F. (1986). Biology of Borrelia species. *Microbiological reviews, 50*(4), 381.

Barbour, A. G., Maupin, G. O., Teltow, G. J., Carter, C. J.& Piesman, J. (1996). Identification of an uncultivable Borrelia species in the hard tick Amblyomma americanum: possible agent of a Lyme disease-like illness. *Journal of Infectious Diseases, 173*(2), 403-409.

Bergström, S., Garon, C., Barbour, A.& MacDougall, J. (1992). Extrachromosomal elements of spirochetes. *Research in microbiology, 143*(6), 623-628.

Black, W. C.& Piesman, J. (1994). Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 91*(21), 10034-10038.

Boden, K., Lobenstein, S., Hermann, B., Margos, G.& Fingerle, V. (2016). Borrelia miyamotoi-Associated Neuroborreliosis in Immunocompromised Person. *Emerg Infect Dis, 22*(9), 1617-1620.

Brahim, H., Perrier-Gros-Claude, J. D., Postic, D., Baranton, G.& Jambou, R. (2005). Identifying relapsing fever borrelia, Senegal. *Emerg Infect Dis, 11*(3), 474.

Brenauer, J. 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.*Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München.

Brocklesby, D., Scott, G.& Rampton, C. (1963). Borrelia theileri and transient fevers in cattle. *Vet. Rec, 75*, 103-104.

Bunikis, J., Garpmo, U., Tsao, J., Berglund, J., Fish, D.& Barbour, A. G. (2004). Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents Borrelia burgdorferi in North America and Borrelia afzelii in Europe. *Microbiology, 150*(6), 1741-1755.

Bunikis, J., Tsao, J., Garpmo, U., Berglund, J., Fish, D.& Barbour, A. G. (2004). Typing of Borrelia relapsing fever group strains. *Emerg Infect Dis, 10*(9), 1661-1664.

Burgdorfer, W., Anderson, J., Gern, L., Lane, R., Piesman, J.& Spielman, A. (1990). Relationship of Borrelia burgdorferi to its arthropod vectors. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum, 77*, 35-40.

Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E.& Davis, J. P. (1982). Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science, 216*(4552), 1317-1319.

Burgdorfer, W., & Varma, G. (1967). Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Annual review of entomology, 12*(1), 347-376.

Burmeister, J., Goßner, M.& Gruppe, A. (2007). Insektengemeinschaften im Kronenraum von Koniferenarten im Forstlichen Versuchsgarten Grafrath. *Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen, 56*(1), 19-28.

Burri, C., Schumann, O., Schumann, C.& Gern, L. (2014). Are Apodemus spp. mice and Myodes glareolus reservoirs for Borrelia miyamotoi, Candidatus Neoehrlichia mikurensis, Rickettsia helvetica, R. monacensis and Anaplasma phagocytophilum? *Ticks Tick Borne Dis, 5*(3), 245-251.

Canica, M. M., Nato, F., Merle, L. d., Mazie, J. C., Baranton, G.& Postic, D. (1993). Monoclonal antibodies for identification of Borrelia afzelii sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian journal of infectious diseases, 25*(4), 441-448.

Casjens, S.& Huang, W. M. (1993). Linear chromosomal physical and genetic map of Borrelia burgdorferi, the Lyme disease agent. *Molecular microbiology, 8*(5), 967-980.

Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Mun Huang, W., Stevenson, B., Rosa, P., Dodson, R. J. (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi. *Molecular microbiology, 35*(3), 490-516.

Chowdri, H. R., Gugliotta, J. L., Berardi, V. P., Goethert, H. K., Molloy, P. J., Sterling, S. L.& Telford, S. R. (2013). Borrelia miyamotoi infection presenting as human granulocytic anaplasmosis: a case report. *Ann Intern Med, 159*(1), 21-27.

Coipan, E. C., Jahfari, S., Fonville, M., Oei, G. A., Spanjaard, L., Takumi, K., Sprong, H. (2016). Imbalanced presence of Borrelia burgdorferi s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Infect Genet Evol, 42*, 66-76.

Coleman, J. L., Benach, J. L., Beck, G.& Habicht, G. S. (1986). Isolation of the outer envelope from Borrelia burgdorferi. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.*

Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology, 263(1), 123-126.

Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S., Vitorino, L., . . . Cunha, C. (2004). First isolation of Borrelia lusitaniae from a human patient. *J Clin Microbiol, 42*(3), 1316-1318.

Comstedt, P., Hanner, M., Schüler, W., Meinke, A.& Lundberg, U. (2014). Design and Development of a Novel Vaccine for Protection against Lyme Borreliosis. *PLoS One, 9*(11), e113294.

Cosson, J.-F., Michelet, L., Chotte, J., Le Naour, E., Cote, M., Devillers, E., Geller, J. (2014). Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit Vectors, 7*, 233.

Crowder, C. D., Carolan, H. E., Rounds, M. A., Honig, V., Mothes, B., Haag, H., Ecker, D. J. (2014). Prevalence of Borrelia miyamotoi in Ixodes Ticks in Europe and the United States. *Emerg Infect Dis, 20*(10), 1678.

Crowder, C. D., Carolan, H. E., Rounds, M. A., Honig, V., Mothes, B., Haag, H., Eshoo, M. W. (2014). Prevalence of Borrelia miyamotoi in Ixodes ticks in Europe and the United States. *Emerg Infect Dis, 20*(10), 1678-1682.

Dai, Q., Restrepo, B. I., Porcella, S. F., Raffel, S. J., Schwan, T. G.& Barbour, A. G. (2006). Antigenic variation by Borrelia hermsii occurs through recombination between extragenic repetitive elements on linear plasmids. *Molecular Microbiology, 60*(6), 1329-1343.

Daniel, M., Danielová, V., Kříž, B.& Kott, I. (2004). An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology Supplements, 293*, 55-62.

Davidson, B., MacDougall, J.& Saint Girons, I. (1992). Physical map of the linear chromosome of the bacterium Borrelia burgdorferi 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. *Journal of bacteriology, 174*(11), 3766-3774.

Davis, G. E.& Burgdorfer, W. (1955). Relapsing fever spirochetes: an aberrant strain of Borrelia parkeri from Oregon. *Exp Parasitol, 4*(2), 100-106.

Davis, G. E. & Hoogstraal, H. (1956). Biology of the spirochete Borrelia persica, found in the tick Ornithodorus tholazani (Argasinae) collected in the governorat of the Western Egyptian Desert; comments on the distribution and ecology of the vector tick. *Ann Parasitol Hum Comp, 31*(1-2), 147-154.

De Michelis, S., Sewell, H.-S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L. M., Benes, V., Kurtenbach, K. (2000). Genetic diversity of Borrelia burgdorferi sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol, 38*(6), 2128-2133.

Dibernardo, A., Cote, T., Ogden, N. H.& Lindsay, L. R. (2014). The prevalence of Borrelia miyamotoi infection, and co-infections with other Borrelia spp. in Ixodes scapularis ticks collected in Canada. *Parasites & Vectors, 7*(1), 1-8.

Dworkin, M. S., Schwan, T. G., Anderson, D. E., Jr.& Borchardt, S. M. (2008). Tick-borne relapsing fever. *Infect Dis Clin North Am, 22*(3), 449-468, viii.

Eisen, L.& Lane, R. S. (2002). Vectors of Borrelia burgdorferi sensu lato. *Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, 91-115.

Estrada-Peña, A. (2001). Distribution, abundance, and habitat preferences of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J Med Entomol, 38*(3), 361-370.

Falco, R. C.& Fish, D. (1988). Ticks parasitizing humans in a Lyme disease endemic area of southern New York State. *American journal of epidemiology, 128*(5), 1146-1152.

Felsenfeld, O., Decker, W. J., Wohlheiter, J. A.& Rafy, A. (1965).Studies in borreliae. II. Some immunologic, biochemical an physical prosperities of the antigenic components of Borrelia turicatae. *J Immunol, 94*, 805-817.

Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Wilske, B. (2008). Epidemiological aspects and molecular characterization of Borrelia burgdorferi sl from southern Germany with special respect to the new species Borrelia spielmanii sp. nov. *International journal of medical microbiology, 298*(3), 279-290.

Fomenko, N. V., Livanova, N. N., Borgoiakov, V., Kozlova, I. V., Shulaikina, I. V., Pukhovskaia, N. M., Ivanov, L. I. (2010). Detection of Borrelia miyamotoi in ticks Ixodes persulcatus from Russia. *Parazitologiia, 44*(3), 201-211.

Fonville, M., Friesema, I. H., Hengeveld, P. D., van Leeuwen, A. D., Jahfari, S., Harms, M. G., Sprong, H. (2014). Human exposure to tickborne relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi, the Netherlands. *Emerg Infect Dis, 20*(7), 1244.

Fraenkel, C.-J., Garpmo, U.& Berglund, J. (2002). Determination of novel Borrelia genospecies in Swedish Ixodes ricinus ticks. *J Clin Microbiol, 40*(9), 3308-3312.

Franke, J., Fritzsch, J., Tomaso, H., Straube, E., Dorn, W.& Hildebrandt, A. (2010). Coexistence of pathogens in host-seeking and feeding ticks within a single natural habitat in Central Germany. *Appl Environ Microbiol, 76*(20), 6829-6836.

Franke, J., Hildebrandt, A.& Dorn, W. (2013). Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes–updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. *Ticks Tick Borne Dis, 4*(1), 11-25.

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. *J Med Entomol, 48*(2), 441-444.

Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., Hickey, E. K. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. *Nature, 390*(6660), 580-586.

Fukunaga, M.& Koreki, Y. (1995). The flagellin gene of Borrelia miyamotoi sp. nov. and its phylogenetic relationship among Borrelia species. *FEMS Microbiol Lett, 134*(2-3), 255-258.

Fukunaga, M., Okada, K., Nakao, M., Konishi, T.& Sato, Y. (1996). Phylogenetic analysis of Borrelia species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. *Int J Syst Bacteriol, 46*(4), 898-905.

Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M.& Nakao, M. (1995). Genetic and phenotypic analysis of Borrelia miyamotoi sp. nov., isolated from the ixodid tick Ixodes persulcatus, the vector for Lyme disease in Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology, 45*(4), 804-810.

Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O., Jarvekulg, L., Fomenko, N.& Golovljova, I. (2012). Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi in Estonian ticks. *PLoS One, 7*(12), e51914.

Gern, L., Douet, V., López, Z., Rais, O.& Cadenas, F. M. (2010). Diversity of Borrelia genospecies in Ixodes ricinus ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick Borne Dis, 1*(1), 23-29.

Godfrey, E. R.& Randolph, S. E. (2011). Economic downturn results in tick-borne disease upsurge. *Parasites & Vectors, 4*(1), 35.

Gray, J. (1991). The development and seasonal activity of the tick Ixodes ricinus: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology, 79*(6), 323-333.

Gray, J., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O.& Lindgren, E. (2009). Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2009*.

Grosskinsky, S., Schott, M., Brenner, C., Cutler, S. J., Kraiczy, P., Zipfel, P. F., Wallich, R. (2009). Borrelia recurrentis employs a novel multifunctional surface protein with anti-complement, anti-opsonic and invasive potential to escape innate immunity. *PLoS One, 4*(3), e4858.

Grosskinsky, S., Schott, M., Brenner, C., Cutler, S. J., Simon, M. M., & Wallich, R. (2010). Human complement regulators C4b-binding protein and C1 esterase inhibitor interact with a novel outer surface protein of Borrelia recurrentis. *PLoS neglected tropical diseases, 4*(6), e698.

Gustafson, R., Jaenson, T. G., Gardulf, A., Mejlon, H.& Svenungsson, B. (1995). Prevalence of Borrelia burgdorferi sensu lato infection in Ixodes ricinus in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 27*(6), 597-601.

Guy, E.& Stanek, G. (1991). Detection of Borrelia burgdorferi in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology, 44*(7), 610-611.

Hahn, H. (2009). *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer DE.

Hamase, A., Takahashi, Y., Nohgi, K.& Fukunaga, M. (1996). Homology of variable major protein genes between Borrelia hermsii and Borrelia miyamotoi. *FEMS Microbiol Lett, 140*(2-3), 131-137.

Hamer, S. A., Hickling, G. J., Keith, R., Sidge, J. L., Walker, E. D.& Tsao, J. I. (2012). Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with Borrelia miyamotoi and Borrelia andersonii in Michigan, U.S.A. *Parasit Vectors, 5*, 231.

Hanincova, K., Mukherjee, P., Ogden, N. H., Margos, G., Wormser, G. P., Reed, K. D., Schwartz, I. (2013). Multilocus sequence typing of Borrelia burgdorferi suggests existence of lineages with differential pathogenic properties in humans. *PLoS One, 8*(9), e73066.

Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S. O., Hassler, D.& Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of Anaplasma phagocytophilum (Ehrlichia sp.), Wolbachia sp., Rickettsia sp., and Babesia sp. in Southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology Supplements, 293*, 86-92.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J.& Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research, 6*(10), 986-994.

Herzer, P., Fingerle, V., Pfister, H. W.& Krause, A. (2014). Lyme borreliosis. *Internist (Berl), 55*(7), 789-802.

Heyman, D. (2004). Control of Communicable Diseases Manual. American Public Health Association. *Washington, DC*.

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S.& Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology, 10*(4), 413-417.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G.& Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology, 11*, 1026-1030.

Hildebrandt, A., Franke, J., Schmoock, G., Pauliks, K., Krämer, A.& Straube, E. (2011). Diversity and coexistence of tick-borne pathogens in central Germany. *J Med Entomol, 48*(3), 651-655.

Holt, S. C. (1978). Anatomy and chemistry of spirochetes. *Microbiological reviews, 42*(1), 114.

Hovis, K. M., McDowell, J. V., Griffin, L.& Marconi, R. T. (2004). Identification and characterization of a linear-plasmid-encoded factor H-binding protein (FhbA) of the relapsing fever spirochete Borrelia hermsii. *Journal of Bacteriology, 186*(9), 2612-2618.

Hovis, K. M., Tran, E., Sundy, C. M., Buckles, E., McDowell, J. V.& Marconi, R. T. (2006). Selective binding of Borrelia burgdorferi OspE paralogs to factor H and serum proteins from diverse animals: possible expansion of the role of OspE in Lyme disease pathogenesis. *Infection and Immunity, 74*(3), 1967-1972.

Hovius, J. W., de Wever, B., Sohne, M., Brouwer, M. C., Coumou, J., Wagemakers, A., Hodiamont, C. J. (2013). A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete Borrelia miyamotoi in Europe. *The Lancet, 382*(9892), 658.

Hue, F., Ghalyanchi Langeroudi, A.& Barbour, A. G. (2013). Chromosome Sequence of Borrelia miyamotoi, an Uncultivable Tick-Borne Agent of Human Infection. *Genome Announc, 1*(5).

Jahfari, S., Herremans, T., Platonov, A., Kuiper, H., Karan, L., Vasilieva, O., Sprong, H. (2014). High seroprevalence of Borrelia miyamotoi antibodies in forestry workers and

individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New microbes and new infections, 2*(5), 144-149.

James, A. M., Liveris, D., Wormser, G. P., Schwartz, I., Montecalvo, M. A.& Johnson, B. J. (2001). Borrelia lonestari infection after a bite by an Amblyomma americanum tick. *Journal of Infectious Diseases, 183*(12), 1810-1814.

Johnson, R. C., Burgdorfer, W., Lane, R. S., Barbour, A. G., Hayes, S. F.& Hyde, F. W. (1987). Borrelia coriaceae sp. nov.: putative agent of epizootic bovine abortion. *International Journal of Systematic Bacteriology, 37*(1), 72-74.

Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A.& Brenner, D. J. (1984). Borrelia burgdorferi sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology, 34*(4), 496-497.

Jouda, F., Perret, J.-L.& Gern, L. (2004). Density of questing Ixodes ricinus nymphs and adults infected by Borrelia burgdorferi sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 4*(1), 23-32.

Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J., Jonas, R., Stein, J.& De Boer, R. (1998). Risk of infection with Borrelia burgdorferi sense lato for a host in relation to the duration of nymphal Ixodes ricinus feeding and the method of tick removal. *Zentralblatt für Bakteriologie, 287*(1), 41-52.

Kampen, H., Rötzel, D. C., Kurtenbach, K., Maier, W. A.& Seitz, H. M. (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.

Karan, L. S., Koliasnikova, N. M., Toporkova, M. G., Makhneva, M. A., Nadezhdina, M. V., Esaulkova, A., Maleev, V. V. (2010). Usage of real time polymerase chain reaction for diagnostics of different tick-borne infections. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*(3), 72-77.

Kiewra, D., Stańczak, J.& Richter, M. (2014). Ixodes ricinus ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of Borrelia burgdorferi sensu lato and Borrelia miyamotoi in Lower Silesia, Poland–Preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis, 5*(6), 892-897.

Kitten, T., Barrera, A. V.& Barbour, A. G. (1993). Intragenic recombination and a chimeric outer membrane protein in the relapsing fever agent Borrelia hermsii. *Journal of bacteriology, 175*(9), 2516-2522.

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I.& Khorana, H. (1971). Studies on polynucleotides: XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology, 56*(2), 341-361.

Koedel, U., Fingerle, V.& Pfister, H. W. (2015). Lyme neuroborreliosis-epidemiology, diagnosis and management. *Nat Rev Neurol, 11*(8), 446-456.

Koetsveld, J., Kolyasnikova, N. M., Wagemakers, A., Toporkova, M. G., Sarksyan, D. S., Oei, A., Hovius, J. W. (2017). Development and optimization of an in vitro cultivation protocol allows for isolation of Borrelia miyamotoi from patients with hard tick-borne relapsing fever. *Clin Microbiol Infect*.

Kollaritsch, H., Chmelík, V., Dontsenko, I., Grzeszczuk, A., Kondrusik, M., Usonis, V.& Lakos, A. (2011). The current perspective on tick-borne encephalitis awareness and prevention in six Central and Eastern European countries: report from a meeting of experts convened to discuss TBE in their region. *Vaccine, 29*(28), 4556-4564.

Krause, P. J., Fish, D., Narasimhan, S.& Barbour, A. G. (2015). Borrelia miyamotoi infection in nature and in humans. *Clin Microbiol Infect, 21*(7), 631-639.

Krause, P. J., Hendrickson, J. E., Steeves, T. K.& Fish, D. (2015). Blood transfusion transmission of the tick-borne relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi in mice. *Transfusion, 55*(3), 593-597.

Krause, P. J., McKay, K., Thompson, C. A., Sikand, V. K., Lentz, R., Lepore, T., Persing, D. (2002). Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human

granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases, 34*(9), 1184-1191.

Krause, P. J., Narasimhan, S., Wormser, G. P., Rollend, L., Fikrig, E., Lepore, T., Fish, D. (2013). Human Borrelia miyamotoi infection in the United States. *N Engl J Med, 368*(3), 291-293.

Krause, P. J., Telford, S. R., Spielman, A., Sikand, V., Ryan, R., Christianson, D., Peck, J. (1996). Concurrent Lyme disease and babesiosis: evidence for increased severity and duration of illness. *Jama, 275*(21), 1657-1660.

Kurtenbach, K., Kampen, H., Dizij, A., Arndt, S., Seitz, H. M., Schaible, U. E.& Simon, M. M. (1995). Infestation of Rodents with Larval Ixodes ricinus (Acari; Ixodidae) Is an Important Factor in the Transmission Cycle of Borrelia burgdorferi sl in German Woodlands. *J Med Entomol, 32*(6), 807-817.

Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S. G., Hoodless, A. N., Nuttall, P. A.& Randolph, S. E. (1998). Differential transmission of the genospecies of Borrelia burgdorferi sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol, 64*(4), 1169-1174.

Kurtenbach, K., Schäfer, S. M., Sewell, H.-S., Peacey, M., Hoodless, A., Nuttall, P. A.& Randolph, S. E. (2002). Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infection and Immunity, 70*(10), 5893-5895.

Lane, R., Piesman, J.& Burgdorfer, W. (1991). Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annual Review of Entomology, 36*(1), 587-609.

Larson, T., Ehrmann, M.& Boos, W. (1983). Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of Escherichia coli, a new enzyme of the glp regulon. *Journal of Biological Chemistry, 258*(9), 5428-5432.

Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O.& Baranton, G. (1997). Characterization of Borrelia lusitaniae sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology, 47*(4), 921-925.

Lindgren, E., Tälleklint, L.& Polfeldt, T. (2000). Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick Ixodes ricinus. *Environmental Health Perspectives, 108*(2), 119.

Lindström, A.& Jaenson, T. G. (2003). Distribution of the common tick, Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in southern Sweden. *J Med Entomol, 40*(4), 375-378.

Logigian, E. L., Kaplan, R. F.& Steere, A. C. (1990). Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *New England Journal of Medicine, 323*(21), 1438-1444.

Logina, I., Krumina, A., Karelis, G., Elsone, L., Viksna, L., Rozentale, B.& Donaghy, M. (2006). Clinical features of double infection with tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis transmitted by tick bite. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 77*(12), 1350-1353.

Lommano, E., Dvorak, C., Vallotton, L., Jenni, L.& Gern, L. (2014). Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland. *Ticks Tick Borne Dis, 5*(6), 871-882.

Lunemann, J. D.& Krause, A. (2003). Heterogeneity of Borrelia burgdorferi: etiopathogenetic relevance and clinical implications. *Zeitschrift fur Rheumatologie, 62*(2), 148-154.

Margos, G., Gatewood, A. G., Aanensen, D. M., Hanincová, K., Terekhova, D., Vollmer, S. A., Bormane, A. (2008). MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of Borrelia burgdorferi. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 105*(25), 8730-8735.

Margos, G., Lane, R. S., Fedorova, N., Koloczek, J., Piesman, J., Hojgaard, A., Fingerle, V. (2016). Borrelia bissettiae sp. nov. and Borrelia californiensis sp. nov. Prevail in Diverse Enzootic Transmission Cycles. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(3), 1447-1452.

Margos, G., Stockmeier, S., Hizo-Teufel, C., Hepner, S., Fish, D., Dautel, H., Jungnick, S. (2015). Long-term in vitro cultivation of Borrelia miyamotoi. *Ticks Tick Borne Dis, 6(2),* 181-184.

Margos, G., Vollmer, S. A., Ogden, N. H.& Fish, D. (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of Borrelia burgdorferi sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution, 11*(7), 1545-1563.

Margos, G., Wilske, B., Sing, A., Hizo-Teufel, C., Cao, W.-C., Chu, C., Fingerle, V. (2013). Borrelia bavariensis sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63*(Pt 11), 4284-4288.

Masuzawa, T. (2004). Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent Borrelia burgdorferi sensu lato in East Asia. *Jpn J Infect Dis, 57*(6), 229-235.

Matuschka, F.-R., Lange, R., Spielman, A., Richter, D.& Fischer, P. (1990). Subadult Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) on rodents in Berlin, West Germany. *J Med Entomol, 27*(3), 385-390.

McDowell, J. V., Wolfgang, J., Tran, E., Metts, M. S., Hamilton, D.& Marconi, R. T. (2003). Comprehensive analysis of the factor H binding capabilities of Borrelia species associated with Lyme disease: delineation of two distinct classes of factor H binding proteins. *Infection and Immunity, 71*(6), 3597-3602.

Meri, T., Cutler, S., Blom, A., Meri, S.& Jokiranta, T. (2006). Relapsing fever spirochetes Borrelia recurrentis and B. duttonii acquire complement regulators C4b-binding protein and factor H. *Infection and Immunity, 74*(7), 4157-4163.

Molloy, P. J., Telford, S. R., 3rd, Chowdri, H. R., Lepore, T. J., Gugliotta, J. L., Weeks, K. E., Berardi, V. P. (2015). Borrelia miyamotoi Disease in the Northeastern United States: A Case Series. *Ann Intern Med, 163*(2), 91-98.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G.& Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17.

Mun, J., Eisen, R. J., Eisen, L.& Lane, R. S. (2006). Detection of a Borrelia miyamotoi sensu lato relapsing-fever group spirochete from Ixodes pacificus in California. *J Med Entomol, 43*(1), 120-123.

Nadelman, R. B., Horowitz, H. W., Hsieh, T.-c., Wu, J. M., Aguero-Rosenfeld, M. E., Schwartz, I., Wormser, G. P. (1997). Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *New England Journal of Medicine, 337*(1), 27-30.

Novy, F.& Knapp, R. (1906). Relapsing Fever And Spirochaetes. *The British Medical Journal*, 1573-1575.

O'Connell, S., Granström, M., Gray, J.& Stanek, G. (1998). Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralblatt für Bakteriologie, 287*(3), 229-240.

Ogden, N. H., Margos, G., Aanensen, D., Drebot, M., Feil, E. J., Hanincova, K., Lindsay, L. (2011). Investigation of genotypes of Borrelia burgdorferi in Ixodes scapularis ticks collected during surveillance in Canada. *Appl Environ Microbiol, 77*(10), 3244-3254.

Padgett, K., Bonilla, D., Kjemtrup, A., Vilcins, I.-M., Yoshimizu, M. H., Hui, L., Kramer, V. (2014). Large Scale Spatial Risk and Comparative Prevalence of Borrelia miyamotoi and Borrelia burgdorferi Sensu Lato in Ixodes pacificus. *PLoS One, 9*(10), e110853.

Perez, C.& Rodhain, F. (1977). Biologie d'Ixodes ricinus L., 1758, 1: Ecologie, cycle evolutif 2: Incidence epidemiologique. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 70,* 187-192.

Platonov, A., Maleev, V. & Karan, L. (2009). Relapsing borrelioses fevers: forgotten and new ones. *Ter Arkh, 82*(11), 74-80.

Platonov, A. E., Karan, L. S., Kolyasnikova, N. M., Makhneva, N. A., Toporkova, M. G., Maleev, V. V., Krause, P. J. (2011). Humans infected with relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi, Russia. *Emerg Infect Dis, 17*(10), 1816-1823.

Platonov, A. E., Sarksyan, D. S., Karan, L. S., Shipulin, G. A., Gordygina, E. V., Malinin, O. V. & Maleev, V. V. (2015). The blood coagulation system and microcirculatory disorders in ixodid tick-borne borreliosis caused by Borrelia miyamotoi. *Ter Arkh, 87*(11), 26-32.

Portnoï, 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.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R.& Deutzmann, R. (2006). Biochemie. Duale Reihe: Stuttgart.

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.& 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.

Reis, C., Cote, M., Paul, R. E.& Bonnet, S. (2011). Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 11*(7), 907-916.

Reye, A. L., Hübschen, J. M., Sausy, A.& Muller, C. P. (2010). Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing Ixodes ricinus ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol, 76*(9), 2923-2931.

Rich, S. M., Armstrong, P. M., Smith, R. D.& Telford, S. R. (2001). Lone star tick-infecting borreliae are most closely related to the agent of bovine borreliosis. *J Clin Microbiol, 39*(2), 494-497.

Richter, D., Debski, A., Hubalek, Z.& Matuschka, F.-R. (2012). Absence of Lyme disease spirochetes in larval Ixodes ricinus ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 12*(1), 21-27.

Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.-R.& Baranton, G. (2006). Delineation of Borrelia burgdorferi sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of Borrelia spielmanii sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56*(4), 873-881.

Richter, D., Schlee, D. B.& Matuschka, F. R. (2003). Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis, 9*(6), 697-701.

Rijpkema, S. G., Tazelaar, D. J., Molkenboer, M. J., Noordhoek, G. T., Plantinga, G., Schouls, L. M.& Schellekens, J. F. (1997). Detection of Borrelia afzelii, Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clinical Microbiology and Infection, 3*(1), 109-116.

Rizzoli, A., Hauffe, H. C., Carpi, G., Vourc'h, G., Neteler, M.& Rosa, R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance, 16*(27), 19906.

Rodríguez-Lázaro, D.& Hernández, M. (2013). Introduction to the Real-time Polymerase Chain Reaction. *Real-time PCR in Food Science: Current Technology and Applications*, 1.

Rollend, L., Fish, D.& Childs, J. E. (2013). Transovarial transmission of Borrelia spirochetes by Ixodes scapularis: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis, 4*(1-2), 46-51.

Rosa, P. A., Tilly, K.& Stewart, P. E. (2005). The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology, 3*(2), 129-143.

Rosen, M., Hamer, S., Gerhardt, R., Jones, C., Muller, L., Scott, M.& Hickling, G. (2012). Borrelia burgdorferi not detected in widespread Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) collected from white-tailed deer in Tennessee. *J Med Entomol, 49*(6), 1473-1480.

Rossmann, E., Kraiczy, P., Herzberger, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Simon, M. M., Wallich, R. (2007). Dual binding specificity of a Borrelia hermsii-associated complement regulator-acquiring surface protein for factor H and plasminogen discloses a putative virulence factor of relapsing fever spirochetes. *The Journal of Immunology, 178*(11), 7292-7301.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A.& 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.

Salkeld, D. J., Cinkovich, S.& Nieto, N. C. (2014). Tick-borne Pathogens in Northwestern California, USA. *Emerg Infect Dis, 20*(3), 493.

Sarih, M. H., Jouda, F., Gern, L.& Postic, D. (2003). First isolation of Borrelia burgdorferi sensu lato from Ixodes ricinus ticks in Morocco. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 3*(3), 133-139.

Sarksyan, D., Platonov, A., Karan, L., Malinin, I., Khalitova, L., Shakhov, V., Maleev, V. (2011). Clinical presentation of" new" tick-borne borreliosis caused by Borrelia miyamotoi. *Ter Arkh, 84*(11), 34-41.

Sarksyan, D. S., Platonov, A. E., Karan, L. S., Shipulin, G. A., Sprong, H.& Hovius, J. W. (2015). Probability of Spirochete Borrelia miyamotoi Transmission from Ticks to Humans. *Emerg Infect Dis, 21*(12), 2273-2274.

Sato, K., Takano, A., Konnai, S., Nakao, M., Ito, T., Koyama, K., Kawabata, H. (2014). Human infections with Borrelia miyamotoi, Japan. *Emerg Infect Dis, 20*(8), 1391-1393.

Satz, N. (2002). Klinik der Lyme Borreliose Verlag Hans Huber Berlin. *Göttingen, Toronto, Seattle*.

Scholz, H. C., Margos, G., Derschum, H., Speck, S., Tserennorov, D., Erdenebat, N., Otgonchimeg, C. (2013). High prevalence of genetically diverse Borrelia bavariensis-like strains in Ixodes persulcatus from Selenge Aimag, Mongolia. *Ticks Tick Borne Dis, 4*(1), 89-92.

Schott, M., Grosskinsky, S., Brenner, C., Kraiczy, P.& Wallich, R. (2010). Molecular characterization of the interaction of Borrelia parkeri and Borrelia turicatae with human complement regulators. *Infection and Immunity, 78*(5), 2199-2208.

Schwaiger, M., Peter, O.& Cassinotti, P. (2001). Routine diagnosis of Borrelia burgdorferi (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical Microbiology and Infection, 7*(9), 461-469.

Schwan, T. G., Battisti, J. M., Porcella, S. F., Raffel, S. J., Schrumpf, M. E., Fischer, E. R., Somerville, G. A. (2003). Glycerol-3-phosphate acquisition in spirochetes: distribution and biological activity of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) among Borrelia species. *Journal of bacteriology, 185*(4), 1346-1356.

Schwan, T. G.& Piesman, J. (2002). Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg Infect Dis, 8*(2), 115-121.

Schwarz, A., Honig, V., Vavruskova, Z., Grubhoffer, L., Balczun, C., Albring, A.& Schaub, G. A. (2012). Abundance of Ixodes ricinus and prevalence of Borrelia burgdorferi s.l. in the nature reserve Siebengebirge, Germany, in comparison to three former studies from 1978 onwards. *Parasit Vectors, 5*, 268.

Schwarz, A., Maier, W. A., 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. *International Journal of Hygiene and Environmental Health, 212*(1), 87-96.

Scoles, G. A., Papero, M., Beati, L.& Fish, D. (2001). A relapsing fever group spirochete transmitted by Ixodes scapularis ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis, 1*(1), 21-34.

Scott, J. C., Wright, D. J. M.& Cutler, S. J. (2005). Typing African relapsing fever spirochetes. *Emerg Infect Dis, 11*(11), 1722-1729.

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F. T.& Pfister, K. (2008). Anaplasma phagocytophilum infection in Ixodes ricinus, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis, 14*(6), 972.

Skotarczak, B., Rymaszewska, A., Wodecka, B. & Sawczuk, M. (2003). Molecular evidence of coinfection of Borrelia burgdorferi sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent,

and Babesia microti in ticks from northwestern Poland. *Journal of Parasitology, 89*(1), 194-196

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D.& Parola, P. (2009). Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. *Parasite, 16*(4), 259-273.

Spiller, G. W. (1986). Tick-borne relapsing fever due to Borrelia hermsii in British Columbia. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal, 134*(1), 46.

Stańczak, J., Kubica-Biernat, B., Racewicz, M., Kruminis-Łozowska, W.& Kur, J. (2000). Detection of three genospecies of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks collected in different regions of Poland. *International Journal of Medical Microbiology, 290*(6), 559-566.

Stanek, G., Fingerle, V., Hunfeld, K. P., Jaulhac, B., Kaiser, R., Krause, A., Gray, J. (2011). Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect, 17*(1), 69-79.

Stanek, G.& Strle, F. (2003). Lyme borreliosis. *The Lancet, 362*(9396), 1639-1647.

Steere, A. C., Berardi, V. P., Weeks, K. E., Logigian, E. L.& Ackermann, R. (1990). Evaluation of the intrathecal antibody response to Borrelia burgdorferi as a diagnostic test for Lyme neuroborreliosis. *Journal of Infectious Diseases, 161*(6), 1203-1209.

Steere, A. C., Coburn, J.& Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation, 113*(8), 1093.

Steere, A. C., Malawista, S. E., Snydman, D. R., Shope, R. E., Andiman, W. A., Ross, M. R.& Steele, F. M. (1977). An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism, 20*(1), 7-17.

Stoenner, H. G. (1974). Biology of Borrelia hermsii in Kelly medium. *Appl Microbiol, 28*(4), 540-543.

Subramanian, G., Sekeyova, Z., Raoult, D.& Mediannikov, O. (2012). Multiple tick-associated bacteria in Ixodes ricinus from Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis, 3*(5-6), 406-410.

Süss, J., Fingerle, V., Hunfeld, K.-P., Schrader, C.& Wilske, B. (2004). Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 47*(5), 470-486.

Swanson, S. J., Neitzel, D., Reed, K. D.& Belongia, E. A. (2006). Coinfections acquired from Ixodes ticks. *Clinical Microbiology Reviews, 19*(4), 708-727.

Takahashi, Y.& Fukunaga, M. (1996). Physical mapping of the Borrelia miyamotoi HT31 chromosome in comparison with that of Borrelia turicatae, an etiological agent of tick-borne relapsing fever. *Clin Diagn Lab Immunol, 3*(5), 533-540.

Takano, A., Goka, K., Une, Y., Shimada, Y., Fujita, H., Shiino, T., Kawabata, H. (2010). Isolation and characterization of a novel Borrelia group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environmental Microbiology, 12*(1), 134-146.

Takano, A., Toyomane, K., Konnai, S., Ohashi, K., Nakao, M., Ito, T., Sato, K. (2014). Tick Surveillance for Relapsing Fever Spirochete Borrelia miyamotoi in Hokkaido, Japan. *PLoS One, 9*(8), e104532.

Takayama, K., Rothenberg, R.& Barbour, A. (1987). Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, Borrelia burgdorferi. *Infection and Immunity, 55*(9), 2311-2313.

Taylor, K. R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H.& Tsubota, T. (2013). Borrelia miyamotoi infections among wild rodents show age and month independence and correlation with Ixodes persulcatus larval attachment in Hokkaido, Japan. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 13*(2), 92-97.

Taylor, K. R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H.& Tsubota, T. (2013). Borrelia miyamotoi infections among wild rodents show age and month independence and correlation with Ixodes persulcatus larval attachment in Hokkaido, Japan. *Vector Borne Zoonotic Dis, 13*(2), 92-97.

Teegler, A., Herzberger, P., Margos, G., Fingerle, V.& Kraiczy, P. (2014). The relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi resists complement-mediated killing by human serum. *Ticks Tick Borne Dis*, 5(6), 898-901.

Telford, S. R., 3rd, Goethert, H. K., Molloy, P. J., Berardi, V. P., Chowdri, H. R., Gugliotta, J. L., & Lepore, T. J. (2015). Borrelia miyamotoi Disease: Neither Lyme Disease Nor Relapsing Fever. *Clin Lab Med, 35*(4), 867-882.

Thorp, A. M., & Tonnetti, L. (2016). Distribution and survival of Borrelia miyamotoi in human blood components. *Transfusion, 56*(3), 705-711.

Trees, A. J. (1978). The transmission of Borrelia theileri by Boophilus annulatus (Say, 1821). *Trop Anim Health Prod, 10*(2), 93-94.

Tsao, J. I., Wootton, J. T., Bunikis, J., Luna, M. G., Fish, D., & Barbour, A. G. (2004). An ecological approach to preventing human infection: vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101*(52), 18159-18164.

Ullmann, A. J., Gabitzsch, E. S., Schulze, T. L., Zeidner, N. S., & Piesman, J. (2005). Three multiplex assays for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato and Borrelia miyamotoi sensu lato in field-collected Ixodes nymphs in North America. *J Med Entomol, 42*(6), 1057-1062.

Wagemakers, A., Jahfari, S., de Wever, B., Spanjaard, L., Starink, M. V., de Vries, H. J., Hovius, J. W. (2017). Borrelia miyamotoi in vectors and hosts in The Netherlands. *Ticks Tick Borne Dis*, 8(3), 370-374.

Wagemakers, A., Koetsveld, J., Narasimhan, S., Wickel, M., Deponte, K., Bleijlevens, B., Hovius, J. W. (2016). Variable Major Proteins as Targets for Specific Antibodies against Borrelia miyamotoi. *J Immunol, 196*(10), 4185-4195.

Wagemakers, A., Oei, A., Fikrig, M. M., Miellet, W. R., & Hovius, J. W. (2014). The relapsing fever spirochete Borrelia miyamotoi is cultivable in a modified Kelly-Pettenkofer medium, and is resistant to human complement. *Parasites & Vectors, 7*(1), 418.

Wallich, R., Moter, S., Simon, M., Ebnet, K., Heiberger, A., & Kramer, M. (1990). The Borrelia burgdorferi flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infection and Immunity, 58*(6), 1711-1719.

Wang, G., Iyer, R., Bittker, S., Cooper, D., Small, J., Wormser, G. P., & Schwartz, I. (2004). Variations in Barbour-Stoenner-Kelly culture medium modulate infectivity and pathogenicity of Borrelia burgdorferi clinical isolates. *Infection and Immunity, 72*(11), 6702-6706.

Wang, G., Van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., Dankert, J. (1997). Genetic and phenotypic analysis of Borrelia valaisiana sp. nov.(Borrelia genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology, 47*(4), 926-932.

Wang, G., Van Dam, A. P., Schwartz, I., & Dankert, J. (1999). Molecular typing of Borrelia burgdorferisensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews, 12*(4), 633-653.

Wilhelmsson, P., Fryland, L., Borjesson, S., Nordgren, J., Bergstrom, S., Ernerudh, J., Lindgren, P. E. (2010). Prevalence and diversity of Borrelia species in ticks that have bitten humans in Sweden. *J Clin Microbiol, 48*(11), 4169-4176.

Wittwer, C., Ririe, K., Andrew, R., David, D., Gundry, R., & Balis, U. (1997). The LightCyclerTM: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques, 22*(1), 176-181.

Wodecka, B. (2012). Biology of Borrelia genus.*Stawonogi. Znaczenie medyczne i gospodarcze*. Akapit, Lublin, 213-220.

Wodecka, B., Leonska, A., & Skotarczak, B. (2010). A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of Borrelia spirochaetes in Ixodes ricinus. *J Med Microbiol, 59*(Pt 3), 309-314.

Wójcik-Fatla, A., Szymanska, J., Wdowiak, L., Buczek, A., & Dutkiewicz, J. (2009). Coincidence of three pathogens [Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti] in Ixodes ricinus ticks in the Lublin macroregion. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 16*(1), 151-158.

Yimer, M., Mulu, W., Ayalew, W., & Abera, B. (2014). Louse-borne relapsing fever profile at Felegehiwot referral hospital, Bahir Dar city, Ethiopia: a retrospective study. *BMC Res Notes, 7*, 250.

Younsi, H., Sarih, M. H., Jouda, F., Godfroid, E., Gern, L., Bouattour, A., Postic, D. (2005). Characterization of Borrelia lusitaniae isolates collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol, 43*(4), 1587-1593.

Websites:

Center for Disease Control and Prevention (2015):

http://www.cdc.gov/lyme/stats/chartstables/reportedcases_statelocality.html [26.09.2015]

Google Maps (2017):

https://www.google.de/maps/@48.1611418,11.4320734,11z [28.06.2017]

VIII. Appendix

Monate			März	April	Mai	Juni	Juli	Aug.	Sept.	Okt.
2012	Gal	M		1		2	1		1	1
		W				1				10
		N		23	12	23	22	3	68	59
	Frax	M				1				
		W								1
		N		10	14	17	9	2	13	7
	Luz	M			1			1		
		W			1	1				
		N		7	9	6	6	2		
2013	Gal	M		6	2	1	1			2
		W		5	1	1	2	1	2	
		N		153	92	60	63	59	14	13
	Frax	M								
		W							1	
		N		18	38	20	46	35	15	10
	Luz	M		2	1			1	1	
		W			1	1		1	1	
		N		6	37	29	19	33	31	9
2014	Gal	M	13	9	2	1				
		W	16	13	4					
		N	29	50	21	33				
	Frax	M	1		2	1				
		W			2					
		N	1		21	13				
	Luz	M			9					
		W	1		1	3				
		N	3		10	5				

Tabelle III.1.1: Anzahl der Zecken aus dem Siebengebirge von 2012 -2014. Gliederung nach den Beprobungsorten und Geschlecht (M=Männlich; W=Weiblich; N=Nymphe)

	Englischer Garten						Grafrath			Oberschleißheim		
	2011			2012			2012			2012		
	M	W	N	M	W	N	M	W	N	M	W	N
März										1	1	
April	62	48	4	119	58	1	109	222				
Mai	70	62	59	57	39	5				16	21	21
Juni	46	33	18	11	27	10						
Juli	6	10	19	4	1	5						
Aug.	11	4	6	2	4	2						
Sept.												
Okt.	3	4	2									
Nov.		15										

Dez.		1										

Tabelle III.1.2: Anzahl der Zecken aus dem Englischen Garten von 2010 - 2012, Grafrath 2012 und Oberschleißheim 2012**.** Gliederung nach dem Geschlecht (M=Männlich; W=Weiblich; N=Nymphe)

Beprobungsort	**Standort**	**Höhe [m üNN]**	**Breitengrad**	**Längengrad**
Englischer Garten, München, Oberbayern	Nördlich	489	48°10'44.79"	11°36'51.74"
Schloss Lustheim Oberschleißheim, Oberbayern	Startpunkt: Hochmuttinger Str.	483	48°14'50.73"	11°34'50.70"
Grafrath, Fürstenfeldbruck, Oberbayern		550	48°11'67"	11°16'67"
Siebengebirge, Bonn, Nordrhein-Westfalen	"Frax"	130	50°39'53.2"	7°13'05.8"
	"Luz"	123	50°39'51.5"	7°13'19.2"
	"Gal"	298	50°39'37.1"	7°14'55.4"

Tabelle III.1.3: Beprobungsdetails der Untersuchungsflächen Englischer Garten (München), Oberschleißheim, Grafrath und Siebengebirge**.**Im Siebengebirge wurden an drei Beprobungsorten geflaggt, die nach der vorliegenden Vegetation die Abkürzungen "Frax", "Luz" und "Gal" erhielten (nähere Informationen siehe Material und Methoden).

Phase	**Zeit**	**Temperatur**	**Wiederholungen**
Erste Denaturierung	15 min	95°C	0
Zyklus			45
Denaturierung	15 s	94°C	
Annealing und Elongation	1 min	60°C	

Tabelle III.2.1: Thermalprofil der *p41 B. burgdorferi* s.l. Simplex Real-Time PCR.

Phase	**Zeit**	**Temperatur**	**Wiederholungen**
Erste Denaturierung	15 min	94°C	0
Zyklus			30
Denaturierung	45 s	94°C	
Annealing	45 s	50°C	
Elongation	1 min	72°C	
Finale Elongation	7 min	72°C	0
Bis zur Probenentnahme	-	4°C	-

Tabelle III.3.1: Thermalprofil der *glpQ* PCR

Gen	**PCR Primer**	**Sequenz**	**Annealing T. (°C)**	**PCR Profil**
clpA	BmclpAF1268 (forward) BmclpA2051R (reverse)	5'-TTG ATC TCT TAG ATG ATC TTG G-3' 5'-CAA ACA TAA ACC TTT TCA GCC TTT AAT A-3'	53,3 56,4	TD 58-50°C, 45 Zyklen
clpX	clpX104F (forward) clpX1277R (reverse)	5'-CTG TTG C**Y**A TTT GTT TTG AAT GC**Y** TC-3' 5'-TAA AGT TTC TTT GCC CAA GG-3'	53,6 53,9	TD 60-52°C, 45 Zyklen
nifS	BmnifF31 (forward) BmnifS892R (reverse)	5'-GAA AAA GTA AAC TCC CTC AGA AAG G-3' 5'-CAA TGA TGC CTG CAA TAT TTG GTG-3'	57 58,9	TD 58-50°C, 45 Zyklen
pepX	Pep361F (forward) Pep1202R (reverse)	5'-AGA GA**Y** TTA AG**Y** TTA **K**CA GG-3' 5'-GTT TCT CTT AAA GA**Y** TGC ATT CC-3'	54 53,3	TD 60-52°C, 45 Zyklen
pyrG	Pyr379F (forward) Pyr1261R (reverse)	5'-TAT TTA GG**K** AGA ACT GTA CAG C-3' 5'-CAG CAT CAA **Y**TA T**R**C CAC AAA C-3'	55 55,5	TD 60-52°C, 45 Zyklen
recG	Rec908F (forward) Rec1779R (reverse)	5'-CTA G**Y**A TTC CT**Y** TAA TTG AGG C-3' 5'-TTC **R**GT TAA AGG TTC CTT ATA AAG-3'	53,4 52,3	TD 60-52°C, 45 Zyklen

rplB	Rpl18F (forward) Rpl769R (reverse)	5'-AAT AAG ACT TAT A**R**G CCA AAA AC-3' 5'-G**R**C CCC AAG G**W**G ATA C-3'	53,3 58,7	TD 60-52°C, 45 Zyklen
uvrA	Uvr1170F (forward) Uvr2181R (reverse) Uvr2178R (reverse)	5'-GAG GCG TTA TCT T**K**C AAC TG-3' 5'-AGA CTC TGG AAG CTT **W**GC-3' 5'-TCT AGA CTC TGG AAG CTT-3'	54,5 56	TD 60-52°C, 45 Zyklen

Tabelle III.3.3: MLST-Primer der 8 *houskeeping*-Gene von *B. miyamotoi*

Phase 1	**Zeit**	**T [°C]**	**Anzahl**
Erste Denaturierung	15 min	95	1x
Touchdown			
Denaturierung	30 s	94	9x
Annealing TD	Jeweils 30 s	60-52 (minus 1°C pro Zyklus)	9x
Elongation	1 min	72	9x
Zyklus			
Denaturierung	30 s	94	36x
Annealing	30 s	52	36x
Elongation	1 min	72	1x
Finale Elongation	7 min	72	1x
Ende	-	4	-

Tabelle III.3.4: Thermalprofil der*recG*PCR TD60-52°C

Phase 1	**Zeit**	**T [°C]**	**Anzahl**
Erste Denaturierung	15 min	95	1x
Touchdown			
Denaturierung	30 s	94	8x
Annealing TD	Jeweils 30 s	55 - 48 (1°C Schritte)	8x
Elongation	1 min	72	8x
Zyklus			
Denaturierung	30 s	94	36x
Annealing	30 s	48	36x
Elongation	1 min	72	1x
Finale Elongation	7 min	72	1x
Ende	-	4	-

Tabelle III.3.5: Thermalprofil der *clpA* PCR TD 55-48°C

Programm-Eigenschaften	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1x	95	10:00
55x	95 —————————— 50	00:08 —————————— 00:10
	72	00:10

Target (°C)	Hold (sec.)	Slope (°C/s)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step delay (cycles)	Aquisition Mode
46	30	0.05	75	0.1	0	Continuous

Tabelle III.4.2: Thermalprofil der *hbb* Schmelzkurvenanalyse

Stamm	**Art**	**µ-2σ**	**Tm1 (°C)**	**µ+2σ**	**µ-2σ**	**Tm2 (°C)**	**µ+2σ**
PHei	*B.garinii*	53,26	**53,98**	54,70			
PBr	*B.garinii*	60,51	**60,68**	60,85	69,19	**69,37**	69,55
PFin	*B.bavariensis*	53,86	**54,41**	54,96			
PGau	*B.afzelii*	67,96	**68,55**	69,14			
Poti B2	*B.lusitaniae*	63,44	**64,20**	64,96	68,16	**69,19**	70,22
VS116	*B.valaisiana*	61,05	**61,42**	61,79			
PKa2	*B.burgdorferi* s.s.	70,29	**70,79**	71,29			
PSig2	*B.spielmanii*	61,55	**62,46**	63,37			

Tabelle III.4.3: Orientierende Schmelzpunkte von 8 angezüchteten Stämmen aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex in der *hbb* Schmelzkurvenanalyse.

Probe	**Genomäquivalenz**	**DNA-Konzentration [ng/µL]**
PBS	10^4	7,45
	10^3	10,19
	10^2	5,09
	10^1	8,97
	10^0	8,21
	10^{-1}	11,47
EDTA-Vollblut	10^4	57,54
	10^3	64,17
	10^2	73,45
	10^1	72,50
	10^0	85,56
	10^{-1}	90,39
	Negativ	93,02

Serum	10^4	5,65
	10^3	8,08
	10^2	9,08
	10^1	5,45
	10^0	7,34
	10^{-1}	6,64
	Negativ I	8,23
	Negativ II	4,5
Kniegelenkspunktat	10^4	8,28
	10^3	6,61
	10^2	8,55
	10^1	7,67
	10^0	6,33
	10^{-1}	5,48
	Negativ	10,41
Liquor	10^4	11,66
	10^3	10,41
	10^2	10,68
	10^1	11,07
	10^0	9,13
	10^{-1}	9,44
	Negativ	9,50

Tabelle III.5.1: Verdünnungsreihe der künstlichen Patientenproben aus EDTA-Vollblut, Serum, Kniegelenkspunktat, Liquor und der Prositivprobe mit PBS-Puffer, vermischt mit *B. miyamotoi* mit entsprechender Konzentration.

Stamm	**Single PCR "Sonde1" [Cy5]**	**Single PCR "Sonde2" [Cy5]**	**Single PCR "Sonde3" [Cy5]**	**Duplex PCR "Sonde2" + "FlaProbe1"**	
				[Cy5]	**[FAM]**
B.garinii OspA 7	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	**16.25**
B.garinii OspA 8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	**16.62**
B.kurtenbachii	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	**22.59**
B.bissettiae	**38.72**	**40.50**	**39.63**	No Ct	**16.02**
B.lusitaniae	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

B.japonica	No Ct	No Ct	**19.49**	No Ct	No Ct
B.duttonii	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
B.anserina	**15.46**	No Ct	**14.97**	No Ct	No Ct
B.recurrentis	**19.98**	No Ct	**21.80**	No Ct	No Ct
B.hermsii	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct	**21.97**
B.parkeri	**32.06**	**32.99**	**34.82**	**34.83**	**41.35**
B.persica	**34.00**	No Ct	**33.05**	No Ct	No Ct
B.miyamotoi JAP	**15.21**	**16.12**	**16.75**	**15.88**	No Ct
B.miyamotoi USA	**11.45**	**10.85**	**13.33**	**12.76**	No Ct
B.miyamotoi EU	**25.81**	**26.71**	**27.33**	**27.14**	No Ct

Tabelle IV.1.1: Vergleich und Spezifitätstest der "Sonden 1, 2 und 3" mit 6 Stämmen aus dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex, 6 Stämmen aus dem Rückfallfieberkomplex und den drei *B. miyamotoi* Stämmen aus Japan, USA und Europa in der *p41* Simplex und Duplex Real-Time PCR.

Mischung aus *B.miyamotoi* und Lyme-Borrelie	**"Sonde2" Simplex PCR Ct-Wert [Cy5] $GE10^2$**	**"FlaProbe1" Simplex PCR Ct-Wert [FAM] $GE10^4$**	**"Sonde2" Simplex PCR Ct-Wert [Cy5] Ohne *B.miyamotoi* $GE10^4$**
Pko (*B. afzelii*)	**32.97**	**24.92**	No Ct
PBi (*B. bavariensis*)	**32.72**	**27.96**	No Ct
PBr (*B. garinii* OspA3)	**32.52**	**26.22**	No Ct
PHei (*B. garinii* OspA5)	**33.44**	**27.19**	No Ct
PRef (*B. garinii* OspA7)	**34.32**	**26.71**	No Ct
PLa (*B. garinii* OspA8)	**32.00**	**27.81**	No Ct
PSig (*B. spielmanii*)	**33.30**	**27.91**	No Ct

Vs116 (*B. valaisiana*)	**32.84**	**26.87**	No Ct
PotiB2 (*B.lusitaniae*)	**32.90**	No Ct	No Ct
PGeb (*B. bissettiae*)	**33.96**	**29.55**	No Ct

Tabelle IV.1.2: Spezifitätstest der beiden Sonden "Sonde2" und "FlaProbe1" in der *p41* Simplex Real-Time PCR mit einer DNA-Mischung aus *B. miyamotoi* und zehn verschiedenen *B. burgdorferi* s.l. Stämmen, sowie einer *p41* Simplex Real-Time PCR mit "Sonde2" und denselben zehn *B. burgdorferi* s.l. Stämmen ohne *B. miyamotoi*.

Genomäquivalenz 10^4 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^{-1}	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	No Ct	**24.90**
PBi (*B. bavariensis*)	No Ct	**27.44**
PBr (*B. garinii* OspA3)	No Ct	**25.83**
PHei (*B. garinii* OspA5)	No Ct	**27.02**
PRef (*B. garinii* OspA7)	No Ct	**26.28**
PLa (*B.garinii* OspA8)	No Ct	**26.46**
PSig (*B. spielmanii*)	No Ct	**27.77**
Vs116 (*B. valaisiana*)	No Ct	**26.39**
PGeb (*B. bissettiae*)	No Ct	**28.44**
PWudII (*B. garinii* OspA6)	No Ct	**25.27**
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	No Ct	**27.30**

Tabelle IV.2.2: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{-1} und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^4

Genomäquivalenz 10^3 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^0	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	No Ct	**27.55**
PBi (*B. bavariensis*)	No Ct	**29.96**
PBr (*B. garinii* OspA3)	No Ct	**28.68**

PHei (*B. garinii* OspA5)	No Ct	**30.45**
PRef (*B. garinii* OspA7)	No Ct	**29.82**
PLa (*B. garinii* OspA8)	**42.08**	**31.60**
PSig (*B. spielmanii*)	**41.41**	**30.83**
Vs116 (*B. valaisiana*)	No Ct	**29.51**
PGeb (*B. bissettiae*)	No Ct	**31.77**
PWudII (*B. garinii* OspA6)	**39.83**	**31.32**
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	No Ct	**30.70**

Tabelle IV.2.3: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^0 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^3

Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^1	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	**39.51**	**30.79**
PBi (*B. bavariensis*)	**39.28**	**33.81**
PBr (*B. garinii* OspA3)	No Ct	**32.12**
PHei (*B. garinii* OspA5)	**35.93**	**34.17**
PRef (*B. garinii* OspA7)	**36.72**	**34.01**
PLa (*B. garinii* OspA8)	**37.29**	**35.13**
PSig (*B. spielmanii*)	**37.14**	**34.69**
Vs116 (*B. valaisiana*)	**35.89**	**33.26**
PGeb (*B. bissettiae*)	**36.32**	**35.04**
PWudII (*B. garinii* OspA6)	**36.78**	**33.12**
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	**39.00**	**34.30**

Tabelle IV.2.4: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^1 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^2

Genomäquivalenz 10^1 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^2	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	**32.00**	**35.04**
PBi (*B. bavariensis*)	**32.96**	**39.10**
PBr (*B. garinii* OspA3)	**32.19**	**35.88**
PHei (*B. garinii* OspA5)	**32.74**	**37.89**
PRef (*B. garinii* OspA7)	**32.99**	**36.56**
PLa (*B. garinii* OspA8)	**34.26**	**39.28**
PSig (*B. spielmanii*)	**32.75**	**37.91**
Vs116 (*B. valaisiana*)	**32.34**	**32.45**
PGeb (*B. bissettiae*)	**32.37**	No Ct
PWudII (*B. garinii* OspA6)	**34.74**	No Ct
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	**35.20**	**38.30**

Tabelle IV.2.6: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^1

Genomäquivalenz 10^0 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^3	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	**28.47**	No Ct
PBi (*B. bavariensis*)	**28.49**	No Ct
PBr (*B. garinii* OspA3)	**28.27**	No Ct
PHei (*B. garinii* OspA5)	**29.03**	No Ct
PRef (*B. garinii* OspA7)	**30.51**	No Ct
PLa (*B. garinii* OspA8)	**31.10**	No Ct
PSig (*B. spielmanii*)	**29.06**	**44.26**
Vs116 (*B. valaisiana*)	**32.52**	**38.90**
PGeb (*B. bissettiae*)	**32.44**	No Ct
PWudII (*B. garinii* OspA6)	**29.01**	No Ct

B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	**31.70**	No Ct

Tabelle IV.2.7: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^3 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^0

Genomäquivalenz 10^{-1} gemischt mit *B. miyamotoi* 10^4	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
Pko (*B. afzelii*)	**26.95**	No Ct
PBi (*B. bavariensis*)	**25.15**	No Ct
PBr (*B. garinii* OspA3)	**25.75**	No Ct
PHei (*B. garinii* OspA5)	**25.71**	No Ct
PRef (*B. garinii* OspA7)	**25.52**	No Ct
PLa (*B. garinii* OspA8)	**25.62**	No Ct
PSig (*B. spielmanii*)	**25.88**	No Ct
Vs116 (*B. valaisiana*)	**24.02**	No Ct
PGeb (*B. bissettiae*)	**25.42**	No Ct
PWudII (*B. garinii* OspA6)	**25.41**	No Ct
B31 (*B.burgdorferi* s.s.)	**28.60**	No Ct

Tabelle IV.2.8: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^4 und elf Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{-1}

Genomäquivalenz 10^4 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^{-1} und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	No Ct	**26.73**
PSig (*Borrelia spielmanii*)	No Ct	**28.62**
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	No Ct	**26.78**
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	No Ct	**30.11**

Tabelle IV.2.9: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^{-1} und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^4 gemischt mit Zecken-DNA.

Genomäquivalenz 10^3gemischt mit *B. miyamotoi* 10^0 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	No Ct	**30.31**
PSig (*Borrelia spielmanii*)	No Ct	**32.12**
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	No Ct	**30.26**
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	**37.95**	**33.40**

Tabelle IV.2.10: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^0 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^3 gemischt mit Zecken-DNA.

Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^1 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	**37.76**	**33.94**
PSig (*Borrelia spielmanii*)	**37.07**	**35.28**
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	**36.75**	**33.96**
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	**40.58**	**36.19**

Tabelle IV.2.11: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^1 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^2 gemischt mit Zecken-DNA.

Genomäquivalenz 10^1 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^2 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	**33.21**	No Ct
PSig (*Borrelia spielmanii*)	**33.34**	No Ct
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	**33.00**	No Ct
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	**33.15**	No Ct

Tabelle IV.2.13: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^2 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^1 gemischt mit Zecken-DNA.

Genomäquivalenz 10^0 gemischt mit *B. miyamotoi* 10^3 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	**29.63**	No Ct
PSig (*Borrelia spielmanii*)	**29.81**	No Ct
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	**29.35**	No Ct
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	**29.92**	No Ct

Tabelle IV.2.14: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^3 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^0 gemischt mit Zecken-DNA.

Genomäquivalenz 10^{-1} gemischt mit *B. miyamotoi* 10^4 und Zecken-DNA	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**
PBr (*Borrelia garinii* OspA3)	**26.60**	No Ct
PSig (*Borrelia spielmanii*)	**27.27**	No Ct
Vs116 (*Borrelia valaisiana*)	**26.00**	No Ct
PGeb (*Borrelia bissettiae*)	**26.54**	No Ct

Tabelle IV.2.15: Sensitivitätstest der *p41* Duplex Real-Time PCR mit *B. miyamotoi* mit der Genomäquivalenz 10^4 und vier Lyme-Borrelienstämmen mit der Genomäquivalenz 10^{-1} gemischt mit Zecken-DNA.

Monat, Jahr	**Untersuchungsfläche**	**Zecken insg.**		**FAM positiv**	**Cy5 positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**		***B.* miyamotoi [%]**	
April 2012	Luz	7	41	2	0	28,6	19,5	0	4,9
	Gal	24		6	2	25		8,3	
	Frax	10		0	0	0		0	
Mai 2012	Luz	11	37	1	0	9,1	24,3	0	0
	Gal	12		3	0	25		0	
	Frax	14		5	0	35,7		0	
Juni 2012	Luz	7	51	1	0	14,3	5,9	0	9,8
	Gal	26		2	2 (2)*	7,7		7,7 (7,7)*	
	Frax	18		0	3 (2)*	0		16,7(1	

								1,1)*	
Juli 2012	Luz	6	38	2	0	33,3	15,8	0	7,9
	Gal	23		4	1	17,4		4,3	
	Frax	9		0	2 (1)*	0		22,2(1 1,1)*	
August 2012	Luz	3	8	0	0	0	12,5	0	0
	Gal	3		1	0	33,3		0	
	Frax	2		0	0	0		0	
Sept. 2012	Luz	0	82	0	0	0	1,2	0	1,2
	Gal	69		1	0	1,4		0	
	Frax	13		0	1 (1)*	0		7,7 (7,7)*	
Okt. 2012	Luz	4	78	0	0	0	3,8	0	2,6
	Gal	70		3	2	4,3		2,9	
	Frax	4		0	0	0		0	

Tabelle IV.3.2: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2012 gegliedert nach den Untersuchungsflächen. *Die Angaben in Klammern beziehen sich auf die B.miyamotoi positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**	**recG MLST**	**glpQ PCR**
G8 4/12 N4/4, 2012	**29.01**	**29.87**	Nicht Gemacht	Negativ
G11 4/12 N3/4, 2012	**18.58**	No Ct	Negativ	n.g.
G7 6/12 N	**25.60**	No Ct	**Positiv**	n.g.
G11 6/12 W	**19.96**	No Ct	**Positiv**	n.g.
F6 6/12 N	**37.41**	No Ct	**Positiv**	n.g.
F11 6/12 N	**24.28**	No Ct	**Positiv**	n.g.
F11 6/12 N	**37.51**	No Ct	Negativ	n.g.
G5 7/12 N	**38.95**	No Ct	Negativ	n.g.
F9 7/12 N	**35.15**	No Ct	Negativ	n.g.
F3 7/12 N	**24.57**	No Ct	**Positiv**	n.g.
F3 9/12 N	**32.41**	No Ct	**Positiv**	n.g.

G11 10/12 W	**29.86**	No Ct	Negativ	n.g.
G12 10/12 N	**39.39**	No Ct	Negativ	n.g.

Tabelle IV.3.3: Nachweis der *B.miyamotoi*positiven Proben aus dem Siebengebirge 2012 mittels *recG*MLST bzw. *glpQ* PCR.

Monat, Jahr	**Untersuchungsfläche**	**Zecken Insg.**		**FAM Positiv**	**Cy5 positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**		***B.* miyamotoi [%]**	
April 2013	Luz	8	190	2 (2)*	0	25	4,7	0	1,1
	Gal	164		6 (6)*	2(2)*	3,7		1,2	
	Frax	18		1 (1)*	0	5,6		0	
Mai 2013	Luz	39	172	2 (2)*	14 [1]' (0)*	5,1	5,2	35,9 [2,6]' (0)*	26,7 [3,5]'
	Gal	95		7 (6)*	12 [2]' (0)*	7,4 (6,3)*		12,6 [2,1]' (0)*	
	Frax	38		0	20 [3]' (1)*	0		52,6 [7,9]' (2,6)*	
Juni 2013	Luz	30	112	5 (4)*	1 (1)*	16,7 (13,3)*	8,9	3,3	1,8 [0,9]'
	Gal	62		2 (2)*	0	3,2 (3,2)*		0	
	Frax	20		3 (2)*	1 [0]'	15 (10)*		5 [0]'	
Juli 2013	Luz	19	131	1 (0)*	1 (1)*	5,3 (0)*	6,9	5,3	1,5
	Gal	66		3 (3)*	1 (1)*	4,5 (4,5)*		1,5	
	Frax	46		5 (5)*	0	10,9 (10,9)*		0	
August 2013	Luz	35	130	4 (4)*	0	11,4	6,2	0	3,8
	Gal	60		3 (2)*	2 (1)*	5,0 (3,3)*		3,3 (1,7)	

								*	
	Frax	35		1 (1)*	3 (2)*	2,9		8,6 (5,7)*	
Sept. 2013	Luz	33		6 (5)*	1 (1)*	18,2 (15,2)*		3	
	Gal	16	65	2 (1)*	1 (1)*	12,5 (6,3)*	15,4	6,3	3,1
	Frax	16		2 (2)*	0	12,5		0	
Okt. 2013	Luz	9		2 (2)*	0	22,2		0	
	Gal	15	34	0	1 (0)*	0	14,7	6,7 (0)*	8,8
	Frax	10		3 (3)*	2 (2)*	30		20	

Tabelle IV.3.5: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2013 gegliedert nach den Untersuchungsflächen.*Die Angaben in runden Klammern beziehen sich auf alle positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten.'Die Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf die B.miyamotoi positiven Zecken, die einen CT-Wert von unter 40 aufwiesen. Nach Rücksprache wurden Werte über 40 als negativ gewertet.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**recG MLST**	**glpQ PCR**
G8 4/13 N12, 2013	**29.71**	**Positiv**	Nicht gemacht
G10 4/13 N5, 2013	**31.32**	**Positiv**	n.g.
F1 5/13 N6, 2013	**22.94**	**Positiv**	n.g.
F1 5/13 N7, 2013	42.92	n.g.	n.g.
F1 5/13 N9, 2013	42.81	n.g.	n.g.
F1 5/13 N10, 2013	43.57	n.g.	n.g.
F2 5/13 N1, 2013	41.87	n.g.	n.g.
F2 5/13 N3, 2013	42.17	n.g.	n.g.
F2 5/13 N4, 2013	41.18	n.g.	n.g.
F3 5/13 N2, 2013	44.10	n.g.	n.g.
F5 5/13 N1, 2013	44.05	n.g.	n.g.
F6 5/13 N2, 2013	42.89	n.g.	n.g.

F8 5/13 N1, 2013	42.42	n.g.	n.g.
F8 5/13 N3, 2013	42.52	n.g.	n.g.
F8 5/13 N4, 2013	42.54	n.g.	n.g.
F9 5/13 N2, 2013	44.73	n.g.	n.g.
F9 5/13 N3, 2013	42.20	n.g.	n.g.
F9 5/13 N4, 2013	42.43	n.g.	n.g.
F9 5/13 N6, 2013	**32.60**	Negativ	n.g.
F9 5/13 N7, 2013	41.96	n.g.	n.g.
F10 5/13 N1, 2013	**35.68**	Negativ	n.g.
F10 5/13 N2, 2013	42.08	n.g.	n.g.
L1 5/13 N1, 2013	42.74	n.g.	n.g.
L2 5/13 N1, 2013	41.97	n.g.	n.g.
L2 5/13 N2, 2013	43.72	n.g.	n.g.
L2 5/13 N4, 2013	41.98	n.g.	n.g.
L12 5/13 N4, 2013	44.97	n.g.	n.g.
L12 5/13 N5, 2013	42.07	n.g.	n.g.
L12 5/13 N6, 2013	42.49	n.g.	n.g.
L12 5/13 N8, 2013	42.36	n.g.	n.g.
L12 5/13 N1, 2013	42.03	n.g.	n.g.
L8 5/13 N1, 2013	**31.03**	Negativ	n.g.
L8 5/13 N3, 2013	44.44	n.g.	n.g.
L9 5/13 N2, 2013	41.89	n.g.	n.g.
L11 5/13 N1, 2013	42.48	n.g.	n.g.
L11 5/13 N2, 2013	43.96	n.g.	n.g.
G9 5/13 N4, 2013	42.95	n.g.	n.g.
G9 5/13 N5, 2013	**36.98**	n.g.	n.g.
G9 5/13 N6, 2013	42.29	n.g.	n.g.

G9 5/13 N7, 2013	43.83	n.g.	n.g.
G10 5/13 N1, 2013	41.37	n.g.	n.g.
G10 5/13 N5, 2013	42.46	n.g.	n.g.
G10 5/13 N9, 2013	42.41	n.g.	n.g.
G10 5/13 N10, 2013	42.41	n.g.	n.g.
G10 5/13 N11, 2013	42.14	n.g.	n.g.
G11 5/13 N6, 2013	**27.81**	Negativ	n.g.
G11 5/13 N10, 2013	42.43	n.g.	n.g.
G1 5/13 N3, 2013	42.36	n.g.	n.g.
L6 6/13 N1, 2013	**25.04**	**Positiv**	n.g.
F1 6/13 N2, 2013	42.67	n.g.	n.g.
L6 7/13 N1, 2013	**24.31**	**Positiv**	n.g.
G1 7/13 N1, 2013	**29.21**	**Positiv**	n.g.
F3 8/13 N2, 2013	**24.50**	Negativ	n.g.
G3 8/13 N3, 2013	**39.93**	Negativ	n.g.
G2 8/13 N2, 2013	**29.77**	**Positiv**	n.g.
F5 8/13 N1, 2013	**26.01**	**Positiv**	n.g.
L9 9/13 N1, 2013	**39.54**	**Positiv**	n.g.
F3 10/13 N1, 2013	**22.30**	**Positiv**	n.g.
F2 10/13 N1, 2013	**37.82**	**Positiv**	n.g.
G10 9/13 3/3, 2013	**24.91**	n.g.	**Positiv**
G7 10/13 1/2, 2012	**38.28**	n.g.	Negativ
F8 8/13 1/1, 2012	**28.10**	n.g.	**Positiv**

Tabelle IV.3.6: Nachweis der *B.miyamotoi* positiven Proben aus dem Siebengebirge 2013 mittels *recG* MLST bzw. *glpQ* PCR.Zusätzlich aufgeführt sind alle falsch positiven Proben mit einem Ct-Wet >40; diese wurden als negativ gewertet und nicht weiter untersucht.

Monat, Jahr	Beprobungsort	Probe	Ct-Wert [FAM]	Stamm
April, 2013	Luz	L6 4/13 N1	39.86	*B. valaisiana*
		L12 4/13 N1	34.7	*B. afzelii*
	Gal	G5 4/13 N8	34.51	*B. valaisiana*
		G8 4/13 N3	38.95	*B. burgdorferi s.s.*
		G8 4/13 N9	38.85	*B. burgdorferi s.s.*
		G10 4/13 N4	34.88	*B. garinii*
		G11 4/13 N1	34.06	*B. burgdorferi s.s.*
		G11 4/13 N2	29.73	*B. garinii*
	Frax	F11 4/13 N2	39.07	*B. afzelii*
Mai, 2013	Luz	L4 5/13 N1	32.04	*B. burgdorferi s.s.*
		L5 5/13 N3	31.28	*B. garinii*
	Gal	G4 5/13 N7	36.38	*B. burgdorferi s.s.*
		G10 5/13 N1	31.95	*B. burgdorferi s.s.*
		G11 5/13 N11	39.01	*B. afzelii*
		G11 5/13 N18	37.64	*B. burgdorferi s.s.*
		G12 5/13 N2	37.65	*B. garinii*
		G12 5/13 N7	38.87	*Negativ*
		G12 5/13 N16	33.06	*B. afzelii*
Juni, 2013	Luz	L9 6/13 N5	33.65	*B. valaisiana*
		L11 6/13 N1	34.42	*Negativ*
		L11 6/13 N2	34.87	*B. valaisiana*
		L11 6/13 N4	36.18	*B. garinii*
		L12 6/13 N5	34.74	*B. valaisiana*

	Gal	G1 6/13 N2	39.46	*B. garinii*
		G8 6/13 N2	33.27	*B. garinii*
	Frax	F1 6/13 N4	33.33	*Negativ*
		F8 6/13 N1	29.83	*B. burgdorferi s.s.*
		F10 6/13 N3	34.63	*B. afzelii*
Juli, 2013	Luz	L7 7/13 N1	39.58	*Negativ*
	Gal	G11 7/13 N3	28.77	*B. valaisiana*
		G11 7/13 N6	27.32	*B. afzelii*
		G12 7/13 N3	28.59	*B. garinii*
	Frax	F1 7/13 N5	30.59	*B. afzelii*
		F2 7/13 N2	32.75	*B. afzelii*
		F2 7/13 N3	31.49	*B. garinii*
		F6 7/13 N3	34.21	*B. burgdorferi s.s.*
		F11 7/13 N1	36.05	*B. burgdorferi s.s.*
August, 2013	Luz	L4 8/13 N3	35.33	*B. afzelii*
		L11 8/13 N1	38.92	*B. garinii*
		L12 8/13 N7	37.95	*B. valaisiana*
		L12 8/13 N11	36.51	*B. valaisiana*
	Gal	G8 8/13 N6	37.84	*B. garinii*
		G10 8/13 N5	36.52	Negativ
		G12 8/13 N2	28.70	*B. afzelii*
	Frax	F7 8/13 N1	35.59	*B. garinii*
September, 2013	Luz	L3 9/13 N1	33.16	*B. afzelii*
		L6 9/13 N1	39.48	*B. garinii*
		L6 9/13 N2	37.29	*B. valaisiana*
		L7 9/13 N1	38.29	*Negativ*

		L12 9/13 N5	34.94	*B. valaisiana*
		L12 9/13 weibl.	35.23	*B. afzelii*
	Gal	G8 9/13 N1	38.51	*Negativ*
		G12 9/13 weibl.	36.78	*B. garinii*
	Frax	F1 9/13 weibl.	33.75	*B. afzelii*
		F12 9/13 N8	37.13	*B. afzelii*
Oktober, 2013	Luz	L6 10/13 N1	33.84	*B. garinii*
		L7 10/13 N1	38.63	*B. garinii*
	Frax	F6 10/13 N1	38.12	*B. afzelii*
		F10 10/13 N1	38,74	*B. garinii*
		F12 10/13 N2	38,3	*B. burgdorferi s.s.*

Tabelle IV.3.4: genaue Klassifizierung der *B. burgdorferi* s.l. Spezies aus dem Siebengebirge 2013 mittels *hbb* PCR und MLST.

Monat, Jahr	**Untersuchungsfläche**	**Zecken insgesamt**		**FAM Positiv**	**Cy5 Positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**		***B.* miyamotoi [%]**	
März 2014	Luz	4	64	0	1 (1)*	0	4,7	25	6,2
	Gal	58		3	3 (2)*	5,2		5,2 (3,4)*	
	Frax	2		0	0	0		0	
April 2014	Luz	0	72	0	0	0	1,4	0	0
	Gal	72		1	0	1,4		0	
	Frax	0		0	0	0		0	
Mai 2014	Luz	21	72	4	3	19	11,1	14,3	4,2
	Gal	27		1	0	3,7		0	
	Frax	24		3	0	12,5		0	
Juni 2014	Luz	8	56	0	0	0	17,9	0	1,8
	Gal	34		8 [7]'	0	23,5 [20,6]'		0	
	Frax	14		3	1	21,4		7,1	

Tabelle IV.3.7: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Siebengebirge 2014 gegliedert nach den Untersuchungsflächen.*Die Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die *B. miyamotoi* positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten.
'Die Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf die positiven Zecken, die einen CT-Wert von unter 40 aufwiesen.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**recG MLST**
L10 3/14 N, 2014	30.70	**Positiv**
G3 3/14 W, 2014	27.88	**Positiv**
G6 3/14 N, 2014	32.09	**Positiv**
G12 3/14 N, 2014	34.22	Negativ
L5 5/14 M, 2014	24.58	Negativ
L6 5/14 M, 2014	23.03	Negativ
L8 5/14 W, 2014	26.30	Negativ
F12 6/14 N, 2014	36.77	Negativ

Tabelle IV.3.8: Nachweis der *B.miyamotoi* positiven Proben aus dem Siebengebirge 2014 mittels *recG* MLST.

Monat, Jahr	**Zecken gesamt**	**FAM Positiv**	**Cy5 Positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**	***B.* miyamotoi [%]**
April 2011	114	27 [19]'	2 (2)*	23,7 [16,7]'	1,8
Mai 2011	191	42 [30]'	6 (6)*	22 [15,7]'	3,1
Juni 2011	97	18 [5]'	0	18,6 [5,1]'	0
Juli 2011	35	13 [6]'	1 (1)*	37,1 [17,1]'	2,9
August 2011	21	10 [7]'	1 (1)*	47,6 [33,3]'	4,8
Oktober 2011	9	2	1 (1)*	22,2	11,1
November 2011	15	3	1 [0]'	20	6,7 [0]'
Dezember 2011	1	0	1 (1)*	0	100

Tabelle IV.3.9: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Englischen Garten 2011.*Die Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die B.miyamotoi positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten. 'Die Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf die positiven Zecken, die einen CT-Wert von unter 40 aufwiesen bzw. eine Amplifikationskurve besaßen.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [Fam]**	**recG MLST**	**glpQ PCR**	**p41 Seq.**
EG-357, 2011	**34.60**	No Ct	1. Versuch Positiv Sequenzierung Negativ 2. Versuch **Positiv**	Nicht gemacht	n.g.
EG-321, 2011	**38.22**	**33.84**	Negativ	n.g.	**Positiv**
EG-519, 2011	**37.84**	No Ct	1. Versuch Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-524, 2011	**39.08**	No Ct	1. Versuch Positiv Sequenzierung Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-536, 2011	**33.49**	No Ct	1. Versuch Negativ 2. Versuch **Positiv**	n.g.	n.g.
EG-545, 2011	**36.26**	No Ct	1. Versuch Positiv Sequenzierung Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-593, 2011	**37.59**	No Ct	1. Versuch Positiv Sequenzierung Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**

EG-403, 2011	**34.83**	No Ct	1. Versuch Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-739, 2011	**34.07**	No Ct	1. Versuch Positiv Sequenzierung Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-747, 2011	**31.44**	No Ct	1. Versuch Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	**Positiv**
EG-792, 2011	**22.62**	No Ct	1. Versuch Negativ 2. Versuch **Positiv**	n.g.	n.g.
EG-796, 2011	**23.87** (kein Graph)	No Ct	1. Versuch Negativ Sequenzierung Negativ 2. Versuch Negativ	n.g.	n.g.
EG-810, 2011	**25.58**	No Ct	**Positiv**	n.g.	n.g.

Tabelle IV.3.11: Nachweis der *B. miyamotoi* aus dem Englischen Garten 2011 mittels *recG* MLST bzw. *glpQ* und *p41* PCR.

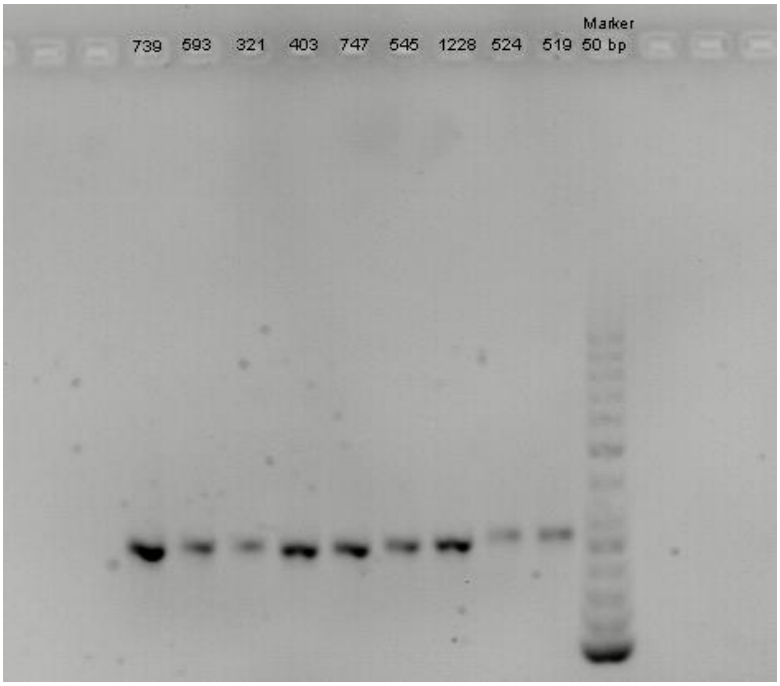


Abbildung IV.3.10: Agarosebild von den Produkten der *p41* SimplexReal-Time PCR. 8 Proben stammten aus dem Englischen Garten 2011 und eine ("EG-1228") aus dem Englischen Garten 2012. Hierbei handelte es sich um in der *p41* Duplex Real-Time PCR *B. miyamotoi* positive Proben, die in der vorangegangenen *glpQ* oder *recG* PCR negativ waren. Die Sequenzierung der *p41* Real-Time PCR Produkte bestätigte eine Infektion mit *B. miyamotoi*.

Monat, Jahr	**Zecken Insgesamt**	**FAM Positiv**	**Cy5 Positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**	***B.* miyamotoi [%]**
April 2012	178	23 [8]'	3 (2)*	12,9 [4,5]'	1,7 (1,1)*
Mai 2012	101	11 [10]'	2	10,9 [9,9]'	2
Juni 2012	48	26 [25]'	3 (2)*	54,2 [52,1]'	6,2 (4,2)*
Juli 2012	10	0	1 [0]'	0	10 [0]'
August 2012	8	2	0	25	0

Tabelle IV.3.12: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus dem Englischen Garten 2012.*Die Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die B. miyamotoi positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten.'Die Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf die positiven Zecken, die einen CT-Wert von unter 40 aufwiesen bzw. eine Amplifikationskurve besaßen.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**	**recG MLST**	**clpA MLST**	**glpQ PCR**	**p41 Seq.**
EG-1135, 2012	**35.86**	No Ct	**Positiv**	Nicht gemacht	Nicht gemacht	Nicht gemacht
EG-1228, 2012	**35.40**	No Ct	Negativ	n.g.	Negativ	**Positiv**
EG-1235, 2012	**36.41**	**40.74**	n.g.	1. Versuch Negativ 2. Versuch Negativ	Negativ	n.g.
EG-898, 2012	**36.10**	No Ct	Negativ	n.g.	n.g.	n.g.
EG-900, 2012	**30.00**	No Ct	Negativ	n.g.	n.g.	n.g.
EG-1023, 2012	**22.28**	No Ct	**Positiv**	n.g.	n.g.	n.g.
EG-1026, 2012	**26.33**	**32.94**	n.g.	n.g.	Negativ	n.g.
EG-1013, 2012	**26.00**	No Ct	**Positiv**	n.g.	n.g.	n.g.

Tabelle IV.3.13: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus dem Englischen Garten 2012 mittels *recG* bzw. *clpA* MLST, *glpQ* und *p41* PCR.

Monat, Jahr	**Zecken gesamt**	**FAM Positiv**	**Cy5 Positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**	***B.* miyamotoi [%]**
April 2012	331	39 [32]'	12 [9]' (4)*	11,8 [9,7]'	3,6 [2,7]' (1,2)*

Tabelle IV.3.14: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus Grafrath 2012.*Die Angaben in runden Klammern beziehen sich auf die *B. miyamotoi* positiven Proben, die in der weiterführenden Diagnostik bestätigt werden konnten. 'Die Angaben in eckigen Klammern beziehen sich auf die positiven Zecken, die einen CT-Wert von unter 40 aufwiesen.

Probe, Jahr	**Ct-Wert [Cy5]**	**Ct-Wert [FAM]**	**recG MLST**	**glpQ PCR**
G-1092	**39.12**	No Ct	Nicht gemacht	Nicht gemacht
G-1064	**40.91**	No Ct	n.g.	n.g.
G-1055	**37.74**	No Ct	n.g.	n.g.
G-1047	**38.90**	No Ct	n.g.	n.g.
G-888	**35.21**	**37.48**	**Positiv**	n.g.
G-992	**26.56**	**29.39**	n.g.	Negativ
G-984	**27.21**	No Ct	**Positiv**	n.g.
G-976	**36.58**	No Ct	Negativ	n.g.
G-783	**35.73**	No Ct	**Positiv**	n.g.
G-814	**29.02**	No Ct	Negativ	**Positiv**
G-863	**42.44**	No Ct	n.g.	n.g.
G-875	**41.28**	No Ct	n.g.	n.g.

Tabelle IV.3.15: Nachweis der *B. miyamotoi* positiven Proben aus Grafrath 2012 mittels *recG* und *glpQ* PCR.

Monat, Jahr	**Zecken gesamt**	**FAM Positiv**	**Cy5 Positiv**	***B.* burgdorferi s.l. [%]**	***B.* miyamotoi [%]**
März 2012	2	0	0	0	0
Mai 2012	58	7	0	12,1	0

Tabelle IV.3.16: Ergebnisse des Zeckenscreenings aus Oberschleißheim 2012.

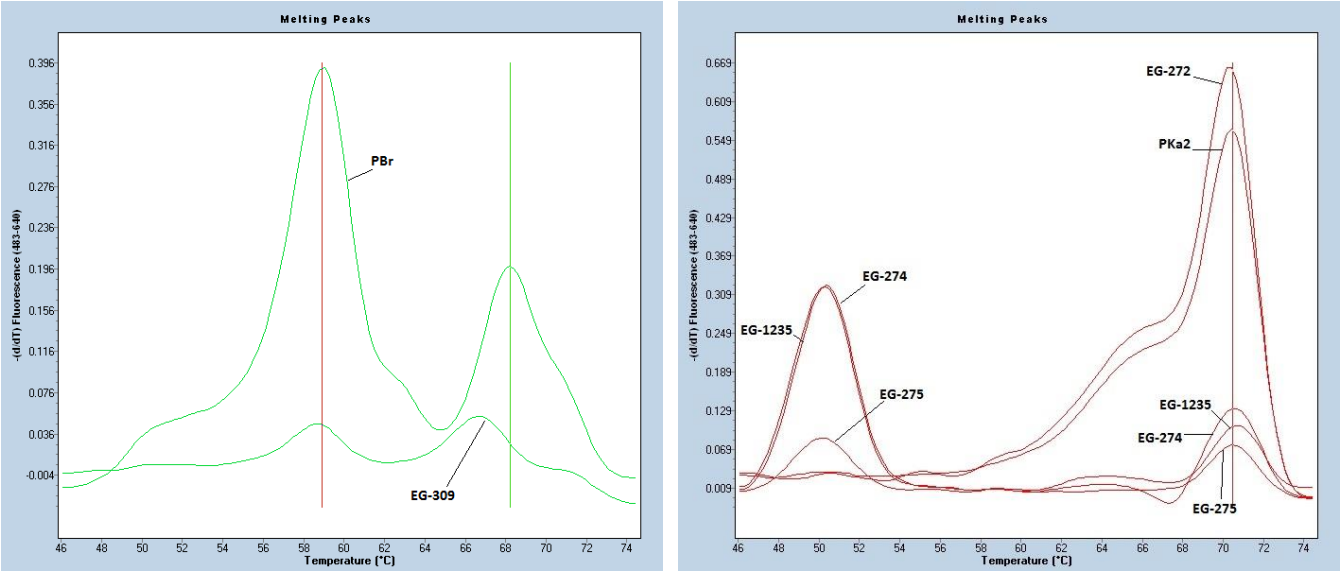


Abbildung IV.5.3: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-309" (links) und den vier Proben "EG-1235", "EG-274", "EG-275" und "EG-272" (rechts), verglichen mit den Schmelzkurven der Positivkontrollen *B. garinii* OspA 3 (PBr) und *B. burgdorferi* s.s (PKa2).Die Schmelztemperaturen der Zecken-Proben waren diesen Kontrollstämmen am ähnlichsten. Diese lagen bei 58,90°C und 68,22°C für "PBr", außerdem bei 70,42°C für "PKa2". Zudem zeigte sich bei drei Proben im rechten Bild eine zusätzliche, unbekannte Kurve bei ca. 50,34°C, die keiner mitgelaufenen Positivprobe zuordenbar war.

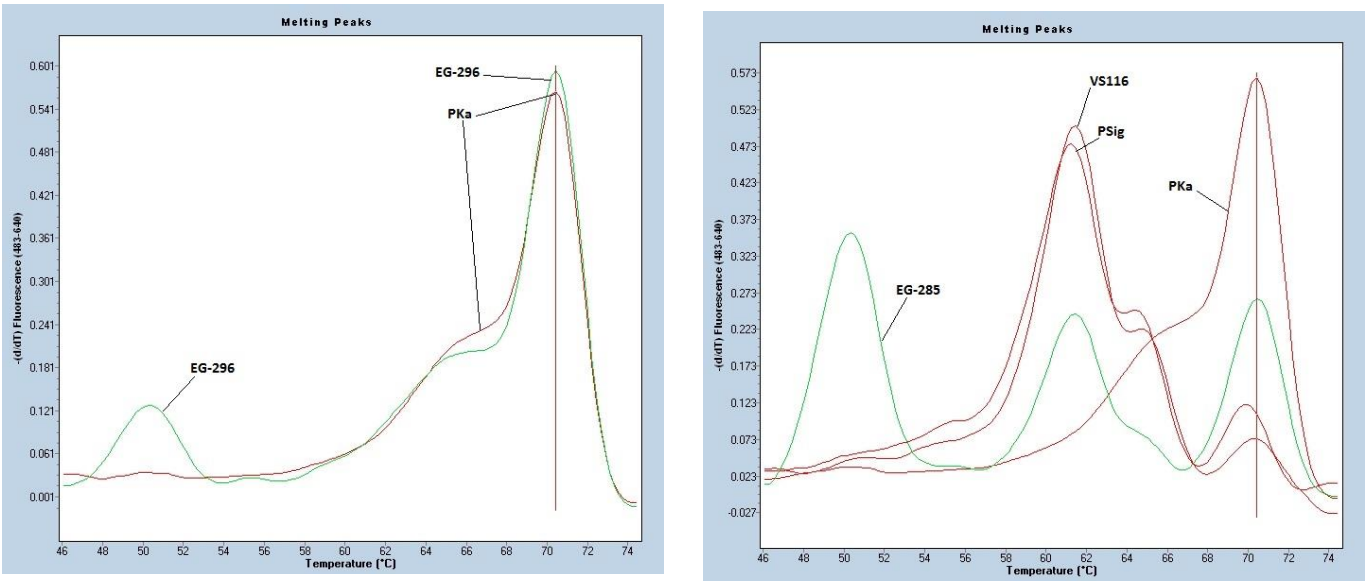
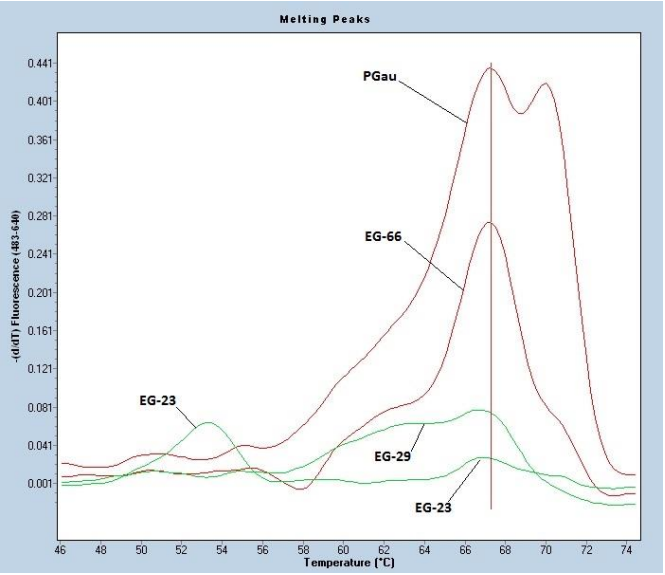


Abbildung IV.5.4: Schmelzkurvenanalyseund -temperatur der Zecken-Proben "EG-296" (links) und "EG-285" (rechts), verglichen mit den Schmelzkurven der Positivkontrollen *B. burgdorferi* s.s (PKa2), sowie *B. valaisiana* (VS116) und *B. spielmannii* (PSig).Die Schmelztemperaturen der Zecken-Proben waren diesen Kontrollstämmen am ähnlichsten. Diese lagen bei 70,42°C für "PKa2", 61,37°C für "VS116" und 61,22°C für "PSig". Zudem zeigte sich bei beiden Proben eine zusätzliche, unbekannte Kurve bei ca. 50,34°C, die keiner mitgelaufenen Positivprobe zuordenbar war.



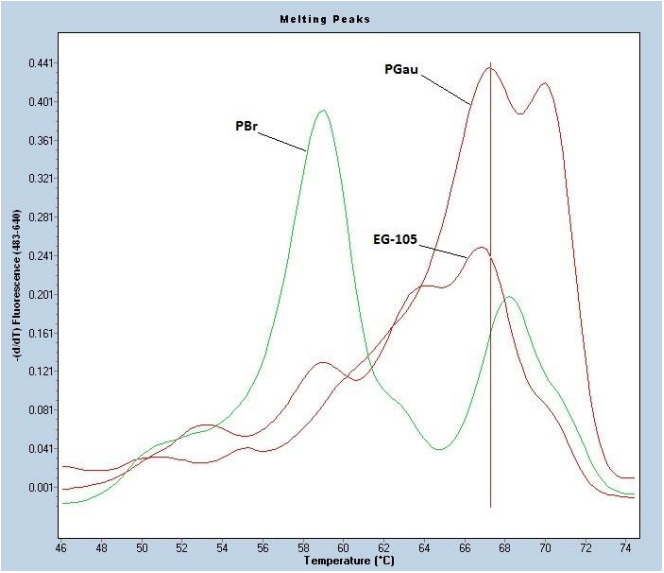


Abbildung IV.5.5: Schmelzkurvenanalyse und -temperatur der Zecken-Proben "EG-23", "EG-66", "EG-29" (links) und "EG-105" (rechts), verglichen mit den Schmelzkurven der Positivkontrollen *B. afzelii* (PGau) und *B. garinii* OspA 3 (PBr), sowie *B. garinii* OspA 5 (PHei) und *B. bavariensis* (PFin)**,** die jedoch nicht im linken Bild miteingefügt worden sind, jedoch der ersten Schmelztemperatur von "EG-23" ähnlich sind. Die Schmelztemperaturen der Kontrollstämme lagen bei 67,28°C für "PGau", 58,90°C und 68,22°C für "PBr", sowie 53,34°C für "PHei" und "PFin". Die Probe "EG-105" links stellte eine Kontamination dar.

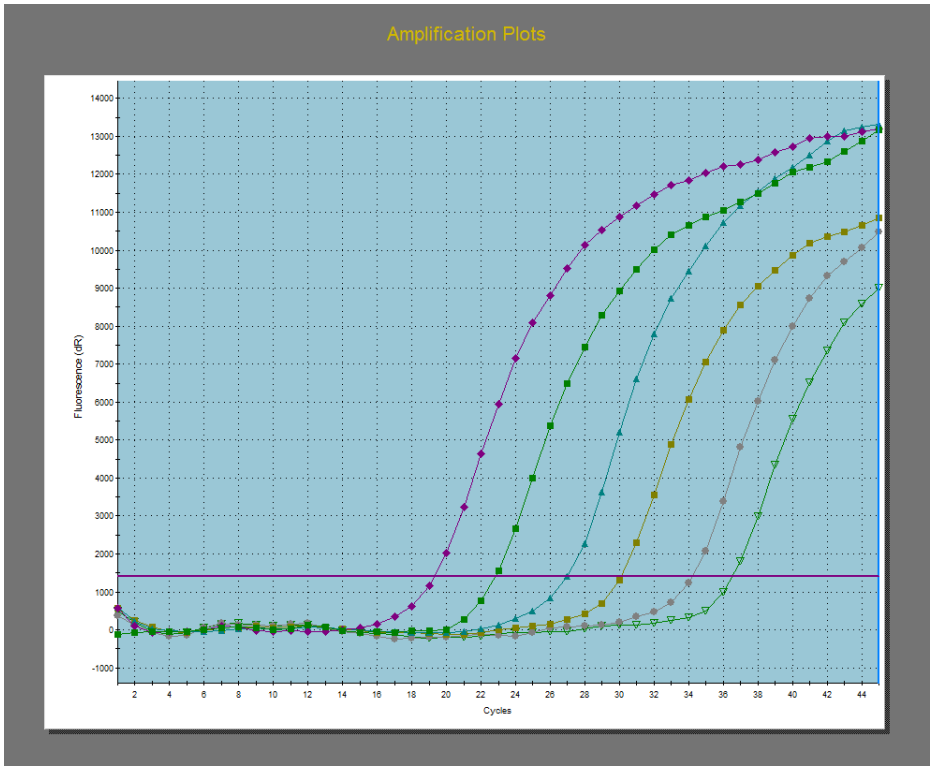
Probe, Jahr	**Infektionsstatus**	**Schmelztemperatur [°C]**	**Stammzuordnung**
EG-85 2010	Koinfiziert	53,34	PFin/PHei
EG-245 2010	Koinfiziert	52,96 67,41	nicht identifizierbar
EG-309 2010	Koinfiziert	58,59 66,60	PBr
EG-1235 2012	Koinfiziert	70,72 50,34	PKa2 und *B.* miyamotoi EU
EG-274 2010	Koinfiziert	70,56 50,34	PKa2 und *B.* miyamotoi EU
EG-275 2010	Koinfiziert	70,43 50,34	PKa2 und *B.* miyamotoi EU
EG-272 2010	Koinfiziert	70,44	PKa2

EG-296 2010	Koinfiziert	70,42 50,34	PKa2 und *B.* miyamotoi EU
EG-285 2010	Koinfiziert	70,52 61,40 50,35	VS116/PSig und *B.* miyamotoi EU
EG-23 2010	Koinfiziert	66,98 53,31	PGau und PHei/PFin
EG-29 2010	Koinfiziert	67,22	PGau
EG-66 2010	Koinfiziert	67,22	PGau
EG-105 2010	Koinfiziert		nicht identifizierbar
EG-244 2010	Koinfiziert		Negativ
EG-6 2010	Koinfiziert		Negativ
EG-211 2012	*B.burgdorferi* s.l.		Negativ
EG-208 2012	*B.burgdorferi* s.l.		Negativ

Tabelle IV.5.6: Zuordnung aller Schmelztemperaturen und Stämme der Zecken-Proben aus dem Englischen Garten 2012 und 2010 mittels *hbb* Schmelkurvenanalyse.Abgesehen von 2 Proben aus dem Jahr 2012 waren alle zuvor in der *p41* Duplex Real-Time PCR als vermeintlich koinfiziert eingestuft worden und sollten auf eine etwaige Kontamination untersucht werden. Nur 5 Proben wiesen in der Schmelzkurvenanalyse eine Koinfektion mit *B. miyamotoi* und *B. burgdorferi* s.l. auf.

PBS-Verdünnungen	**Ct-Wert [Cy5]**
10^{-1}	36.58
10^{0}	34.24
10^{1}	30.12
10^{2}	27.01
10^{3}	22.85
10^{4}	19.35

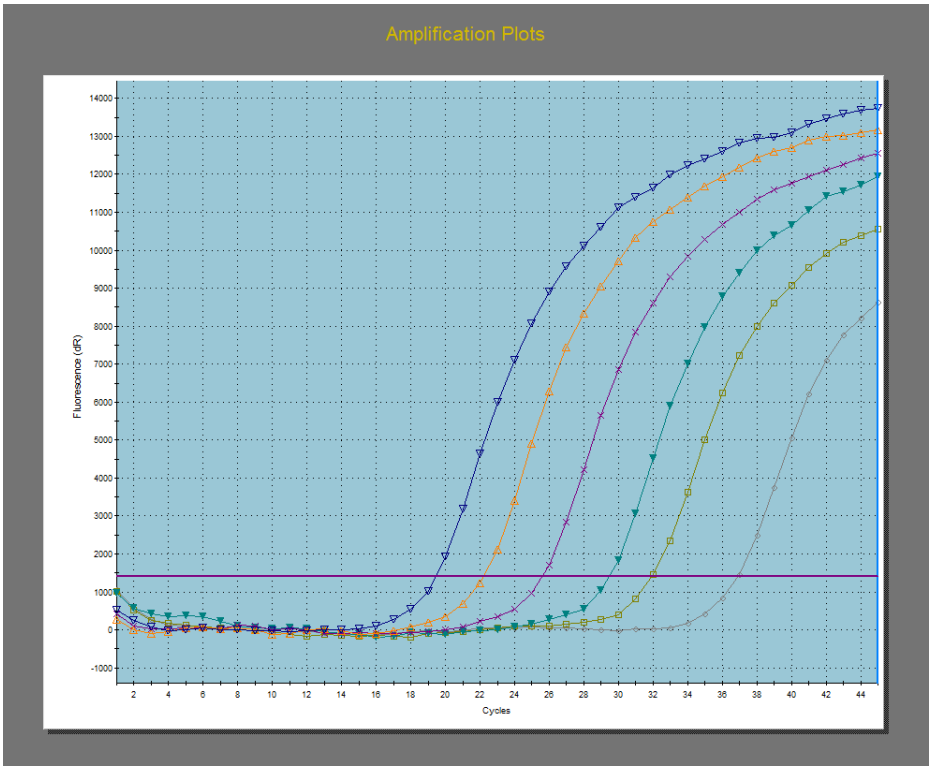
Tabelle IV.6.3: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit PBS Puffer.



AbbildungIV.6.4: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.Verdünnungsreihe mit PBS Puffer.

Blutserum-Verdünnungen	**Ct-Wert [Cy5]**
10^{-1}	36.92
10^{0}	31.95
10^{1}	29.55
10^{2}	25.65
10^{3}	22.23
10^{4}	19.50

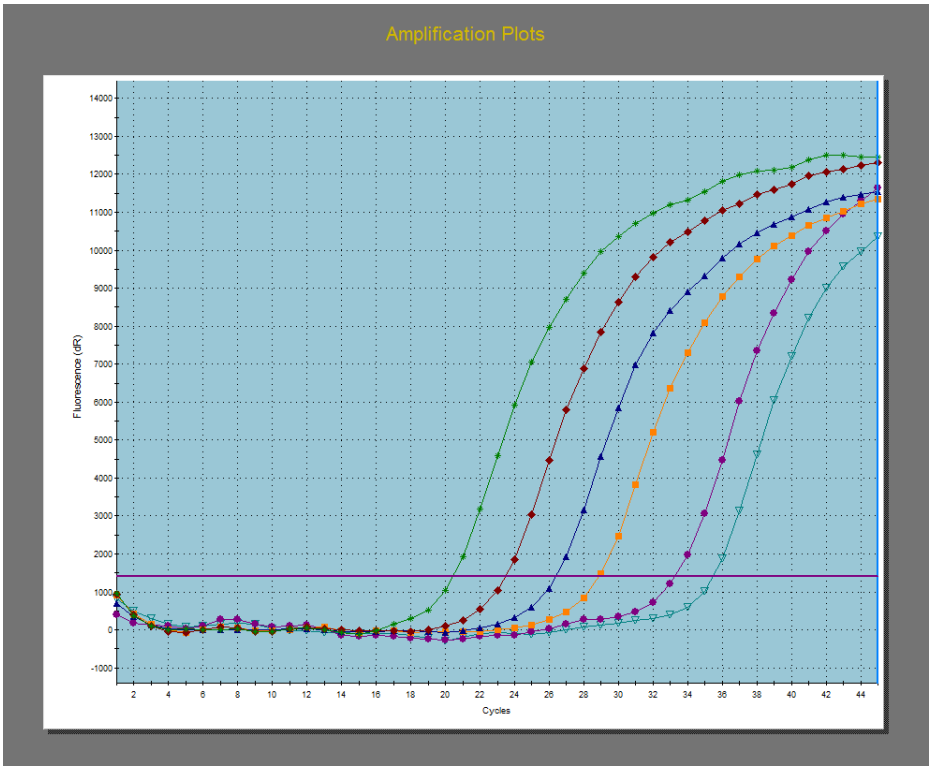
Tabelle IV.6.5: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Blutserum.



AbbildungIV.6.6: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.Verdünnungsreihe mit Blutserum.

Kniegelengspunktat-Verdünnungen	**Ct-Wert [Cy5]**
10^{-1}	35.54
10^{0}	33.30
10^{1}	28.92
10^{2}	26.45
10^{3}	23.51
10^{4}	20.49

Tabelle IV.6.7: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Kniegelenkspunktat.



AbbildungIV.6.8: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.Verdünnungsreihe mit Kniegelenkspunktat.

Liquor-Verdünnungen	**Ct-Wert [Cy5]**
10^{-1}	35.48
10^{0}	33.46
10^{1}	29.85
10^{2}	26.41
10^{3}	22.86
10^{4}	19.38

Tabelle IV.6.9: Ct-Werte der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell. Verdünnungsreihe mit Liquor.

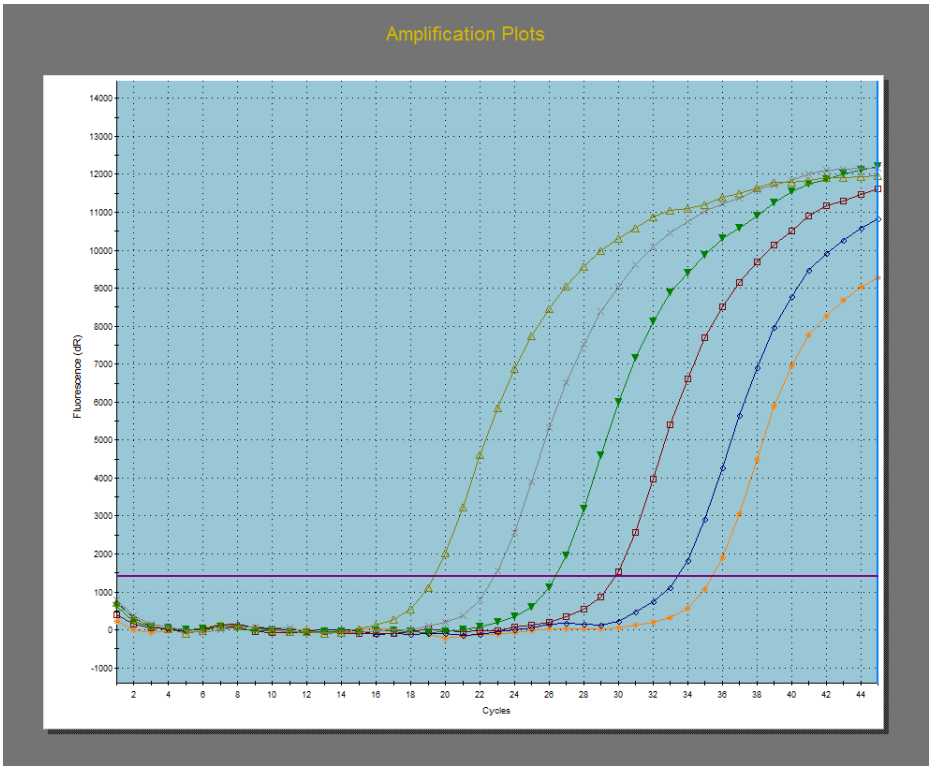


Abbildung IV.6.10: Darstellung der Amplifikationskurven der *p41* Real-Time PCR am künstlichen Patientenmodell.Verdünnungsreihe mit Liquor.

IX. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich endlich die Worte zu Papier bringen, die ich sowohl in meiner Zeit im Labor als auch während des Schreibens manchen Mitmenschen zu oft und manchen zu selten gesagt habe.

Ich danke herzlichst Herrn **Prof. Dr. med. Dr. phil. Andreas Sing**, dass er mir dieses interessante Thema überlassen und mich freundlich empfangen und aufgenommen hat.

Herrn **Dr. med. Volker Fingerle** und Frau **Dr. rer. nat. Gabriele Margos** möchte ich besonders für die kompetente, freundliche Betreuung und die zahlreichen guten Tipps bedanken, die mich vor der verzweifelten Ratlosigkeit bewahrt haben. An die zahlreichen unterhaltsamen Gespräche bei Kaffee und Kuchen oder französischem Weißwein blicke ich mit Freude zurück.

Mit einer Engelsgeduld zeigte mir Frau **Cecilia Hizo-Teufel** das Labor und alle Arbeitsschritte. Dank ihr konnte ich mich schnell zurechtfinden.
Ich möchte mich auch bei den restlichen Mitarbeitern des NRZ Borrelien Labors bedanken. Danke **Sylvia Stockmeyer** für die Hilfe bei der Kultivierung. Danke **Wiltrud Strehle** fürs "Unter-die-Arme-greifen".

Ein großer Dank gebührt auch den Kolleginnen im EHEC-Labor, vor allem **Sabine Wolf** und **Jasmin Fräßdorf**. Auch sie haben mich kompetent eingearbeitet und mir die Bedienung der Geräte gezeigt. Vielen Dank Frau **Daniela Sebah** für die Bereitstellung der Geräte und die strenge "Erziehung".

Nicht zu vergessen ist Frau **Lisa Knoke**, die mich beim Screenen unterstützt hat, mir viele Ratschläge im Labor und zum wissenschaftlichen Arbeiten gegeben hat und zu der ich auch privat eine gute Beziehung aufbauen konnte.

Danke **Sissi, Mark** und **Nadera** für die wunderbar unterhaltsamen Mittagspausen.

Ich möchte mich außerdem bei all meinen Freunden und Bekannten bedanken, dass sie mir so oft zur Seite standen und mir auch bei der Installation überlebensnotwendiger Programme, wie z.B. EndNote geholfen haben, sonst hätte ich mir die Finger wund getippt. Vielen Dank fürs Korrekturlesen, **Stefanie Benedikter**.

Zuletzt möchte ich an dieser Stelle den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: Meiner Familie.
Ich danke meinen Eltern **Dr. Josef Venczel** und **Dr. Marta Venczel**, dass sie mir immer den richtigen Weg zeigen und immer für mich da sind. Sie sind meine Familie, Freunde und Mentoren. Nur durch ihre Unterstützung war es mir möglich, Medizin zu studieren und es so weit zu bringen.
Ich möchte auch meinen Großeltern **Charlotte Venczel**, **Valeria Farkas**, **Imre Farkas** und meinen geliebten Geschwistern **Aron Venczel** und **Anna Venczel** danken, dass sie mich mit Humor und Freundschaft in allen Lebenssituation unterstützen.
Vielen Dank an meinen "Fels in der Brandung", **Maximilian Einmayr**, der mich liebevoll und unerschöpflich unterstützt hat!!

X. Veröffentlichungen

- Venczel R., Margos G., Knoke L., Pavlova M., Dzaferovic E., BinderK., Schaub G. A., Sing A., Fingerle V. (Oberschleißheim, Bochum, Germany). 2014. In vitro Cultivation and Development of Diagnostic Tools for the Emerging Pathogen Borrelia miyamotoi. Workshop on Ticks and Tick-Born Diseases, 30.09 - 02.10.2014, Berlin, Germany

- Schaub G. A., Knoke L., Steinmann A. K., Muminovic A., Balczun C., Schwarz A., Venczel R., Margos G., Fingerke V. (Bochum, Oberschleißheim, Germany). 2014. Abundances of Ixodes ricinus and Prevalences of Borrelia sp. in the Nature Reserve Siebengebirge, Germany.Workshop on Ticks and Tick-Born Diseases, 30.09 - 02.10.2014, Berlin, Germany

- Venczel R., Knoke L., Hizo-Teufel C., Stockmeyer S., Sing A., Dzaferovic E., Schaub G. A., Margos G., Fingerle V. A novel duplex PCR for simultaneous detection of Borrelia burgdorferi s.l. andBorrelia miyamotoi.66. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 05.10 - 08.20.2014, Dresden, Germany

- Venczel R., Knoke L., Pavlovic M., Dzaferovic E., Vaculova T., Silaghi C., Overzier E., Konrad R., Kolenčík S., DerdakovaM., Sing A., Schaub G. A., Margos G., Fingerle V. (2016).A novel duplex real-time PCR permits simultaneous detection and differentiation of Borrelia miyamotoi and Borrelia burgdorferi sensu lato.*Infection, 44*(1), 47-55.

XII. Eidesstattliche Erklärung

Vor- und Zuname: Rita Venczel

Geburtsdatum: _____

Geburtsort: _____

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Entwicklung und Validierung einer neuen *p41* Duplex Real-Time PCR zum simultanen Nachweis und zur Differenzierung von *Borrelia miyamotoi* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato

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.

München, den 27.11.2018 — Rita Venczel

Ort, Datum — Unterschrift Doktorandin