

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
Lehrstuhl für Virologie
Institut der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Oliver Keppler

***Nachweis von Rickettsien in Zecken aus der Region
Mühldorf/Inn, Oberbayern***

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

vorgelegt von

Veronika Bauer

aus

Traunstein

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Heinz Herbinger
Prof. Dr. Gabriele Rieder

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Gerhard Dobler
Dr. Silke Wölfel

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2023

Meiner Großmutter Gudrun Wagner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Zusammenfassung.....	6
Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Rickettsien – Historie und Klassifikation	11
1.2 Rickettsiosen – Infektion und klinische Symptome	13
1.3 Diagnostik	14
1.3.1 Kulturverfahren	14
1.3.2 PCR-Nachweis	14
1.3.3 Antikörpernachweise	14
1.4 Krankheitsverlauf und Therapie	15
1.5 Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe in Deutschland und ihre Vektoren	15
1.5.1 <i>Rickettsia helvetica</i>	17
1.5.2 <i>Rickettsia monacensis</i>	18
1.5.3 <i>Rickettsia slovaca</i>	18
1.5.4 <i>Rickettsia raoultii</i>	19
1.5.5 <i>Rickettsia felis</i>	20
1.5.6 <i>Rickettsia aeschlimannii</i>	20
1.5.7 <i>Rickettsia massiliae</i>	21
1.5.8 <i>Candidatus Rickettsia vini</i>	21
1.5.9 Gesamtprävalenz von Rickettsien und Co-Infektionen	21
1.6 Seroprävalenzen	22
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Auswahl der Standorte	23
2.2 Zecken sammeln	24
2.3 Laboruntersuchungen	25
2.3.1 Gewebehomogenisation	26
2.3.2 Nukleinsäureextraktion	26
2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.3.4 Multi Locus Sequence Typing	31
2.3.5 Gelelektrophorese	33
2.3.6 Aufreinigung des PCR-Produkts	34
2.3.7 Sequenzierung	34
2.3.8 Phylogenetische Analyse	34
2.3.9 Zellkultur Rickettsien	35
2.3.10 Infektionsnachweis mit Indirektem Immunfluoreszenz-Test (IIFT)	36

3	Ergebnisse	38
3.1	PCR-Ergebnisse	54
3.2	Erregeranzucht	67
3.3	Indirekte Immunfluoreszenz Technik	70
4	Diskussion	76
4.1	Daten zum Vorkommen von Rickettsien.....	76
4.2	Verbesserung der Fähigkeiten zur Detektion	77
4.3	Verbesserung der Fähigkeiten zur Erregerisolation und kulturelle Gewinnung von neuen Rickettsienisolaten	79
4.4	Klärung des Vorkommens einer einmalig im Jahr 2004 gefundenen Rickettsien-Spezies mit Ähnlichkeit zu <i>R. massiliae</i>	81
	Literaturverzeichnis	84
	Anhang:	92
	Danksagung	96
	Affidavit	97
	Publikationsliste	98

Zusammenfassung

In einer bisher nicht beprobten Region im Landkreis Mühldorf/Inn wurden zur Bestimmung der Prävalenz und Variabilität von Rickettsien Zecken gescreent und – nach Hinweisen aus früheren Untersuchungen – auf das mögliche Vorkommen einer der *Rickettsia (R.) massiliae* ähnlichen Rickettsien-Art untersucht. Es wurden 1084 Zecken der Art *Ixodes (I.) ricinus* untersucht, davon 55 Männchen, 79 Weibchen, 941 Nymphen und 9 Larven. Die mittels Flagging gesammelten Tiere wurden in Lysing Matrix A Tubes sortiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Adulte Zecken wurden einzeln, Nymphen und Larven ab Probe 531 in Pools zu je drei Stück untersucht. Dabei wurden die Zecken zunächst homogenisiert und Nukleinsäuren extrahiert. Die Eluate wurden mittels einer Pan *Rickettsia* Real-Time-PCR gescreent. 59 Proben wurden auf Rickettsien positiv getestet. Zur Bestimmung der vorliegenden Rickettsien-Spezies erfolgte mit allen positiven Proben eine *R. helvetica* spezifische Real-Time-PCR und zusätzlich ein Multi Locus Sequence Typing der Genorte 16S rDNA, 5S-23S intergenetic spacer region, OmpA und OmpB mit anschließender Gelelektrophorese und Sequenzierung. Von den positiven Proben/Probenpools erwiesen sich 36 als *R. helvetica* und 5 als *R. monacensis*, 18 Proben/Probenpools ließen sich aufgrund der zu niedrigen Nukleinsäure-Konzentration nicht weiter differenzieren. Proben, die einen cycle-threshold < 35 aufwiesen wurden mittels Shell-Vial-Technik und konventionell in Zellkultur angezüchtet. Aus den Shell Vials fand nach 6-8 Tagen eine Passage in kleine Zellkulturflaschen statt. Der Erfolg der Anzucht wurde mittels Real-Time-PCR durch deutliche Abnahme des cycle-threshold-Werts (≥ 2) gezeigt, stichprobenartig wurde zusätzlich ein Nachweis per Immunfluoreszenz durchgeführt. Erfolgreich angezogene Rickettsien wurden mit den Zellen geerntet und bei -80°C eingelagert. Insgesamt waren 35 Anzuchten erfolgreich (32 *R. helvetica*/ 3 *R. monacensis*). Die Anzucht in Shell Vials zeigte einen deutlich höheren Anzuchterfolg. In den untersuchten Genorten des Multi Locus Sequence Typing zeigten sich keine Unterschiede innerhalb der untersuchten Rickettsien-Spezies. Die 2004 in der 16S-Sequenz *R. massiliae*-ähnliche Spezies wurde im beprobten Gebiet nicht erneut nachgewiesen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Genus <i>Rickettsia</i>	12
Abbildung 2 Eschar	13
Abbildung 3 Nachweise von Rickettsien in Deutschland	16
Abbildung 4 Lage der Standorte	23
Abbildung 5 Standort Hohenbuchbach	24
Abbildung 6 Zeckenfahne und Schutzausrüstung	25
Abbildung 7 Absammeln von der Zeckenfahne	25
Abbildung 8 Beispiel Grafik Real-Time-PCR und CT-Werte	28
Abbildung 9 Verteilung der nachgewiesenen Rickettsien-Spezies in den Sammelorten	61
Abbildung 10 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen 16S rDNA Gens	63
Abbildung 11 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse der 5S-23S intergenetic spacer region	64
Abbildung 12 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompA (Fragment IV) Gens	65
Abbildung 13 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompB Gens	66
Abbildung 14 Phylogenetischer Stammbaum der verfügbaren Sequenzen von <i>Rickettsia monacensis</i> (aus Mühldorf) des partiellen ompA (Fragment I) Gens von <i>Rickettsia monacensis</i>	67
Abbildung 15 Anzuchtkontrolle mittels IIFT <i>R. monacensis</i>	73
Abbildung 16 Anzuchtkontrolle mittels IIFT <i>R. helvetica</i>	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Rickettsien, ihre Vektoren und Prävalenz im Vektor in Deutschland	17
Tabelle 2 Standortkoordinaten	24
Tabelle 3 Pan- <i>Rickettsia</i> PCR	29
Tabelle 4 Mastermixprotokoll Pan- <i>Rickettsia</i> PCR	29
Tabelle 5 Thermoprofil Pan- <i>Rickettsia</i> PCR	29
Tabelle 6 <i>Rickettsia helvetica</i> spezifische PCR	30
Tabelle 7 Mastermixprotokoll <i>Rickettsia helvetica</i> spezifische PCR	30
Tabelle 8 Thermoprofil <i>Rickettsia helvetica</i> spezifische PCR (Touch down Protokoll)	31
Tabelle 9 Übersicht Genorte MLST	32
Tabelle 10 Mastermixprotokoll für 18 Reaktionen konv PCR MLST	32
Tabelle 11 Thermoprofil konventionelle PCR MLST OmpB	33
Tabelle 12 Thermoprofil konventionelle PCR MLST OmpA I und IV	33
Tabelle 13 Thermoprofil konventionelle PCR MLST 16S-rDNA	33
Tabelle 14 Thermoprofil konventionelle PCR MLST 5S-23S	33
Tabelle 15 Übersicht Mühldorfzecken	54
Tabelle 16 positive Ergebnisse Pan <i>Rickettsia</i> PCR	57
Tabelle 17 Ergebnisse <i>Rickettsia helvetica</i> spezifischen PCR	59
Tabelle 18 Ergebnisse MLST	61
Tabelle 19 Minimale Infektionsrate (MIR)	62
Tabelle 20 Zellkulturelle Verfahren im Vergleich SV versus T25	70

Tabelle 21 Erfolg Temperaturvergleich Anzucht <i>R. monacensis</i>	70
Tabelle 22 Ergebnisse IIFT	71

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CT	cycle-threshold
ΔCT	DeltaCT (CT-Wert am Tag der Ernte (dx) - CT-Wert am Tag der Anzucht (d0))
cm ²	Quadratcentimeter
d	Tag
D.	Dermacentor
DEBONEL	Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	und andere
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FSME	Frühsommermeningoenzephalitis
for	forward
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanin
gltA	Citrat-Synthase Gen
I.	Ixodes
IIFT	Indirekt Immunfluoreszenz Technik
l	Liter
MD	Mühdorfzecken Probenbezeichnung
m	Meter
m ²	Quadratmeter
mol	Stoffmengenkonzentration
MEM	Minimal essential medium
-mer	meros (Anzahl der Untereinheiten die ein Molekül bilden)
μ	Mikro
μl	Mikroliter

µmol	Mikromol
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MLST	Multilocus Sequenze Typing
min	Minute
MIR	Minimale Infektionsrate
Omp	Outer membrane protein
PBS	Phosphate bufferd saline
PCR	Polymerase chain reaction
%	Prozent
R.	Rhipicephalus
rDNA	ribosomale DNA
rev	reverse
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
S	Svedberg (Einheit für Sedimentationskoeffizienten von Teilchen)
SV	Shell Vial
T	Thymin
Taq	DNA abhängige DNA-Polymerase benannt nach <i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris Acetat EDTA Puffer
TIBOLA	Tick-borne Lymphadenitis
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
T25	Zellkulturflasche mit Fläche 25cm ²
U	Units (Einheit enzymatischer Aktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VERO E6	epithelialen Nierenzellen der grünen Meerkatze
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Vektorübertragene Infektionskrankheiten sind in Deutschland keine seltenen Importe aus exotischen Reisegebieten mehr, sie rücken zunehmend in den Fokus. Die Gefahr der Infektion nimmt auch innerhalb Deutschlands mit der Ausbreitung von bisher nicht endemischen Vektoren und entsprechenden Pathogenen, bedingt durch Klimawandel, Globalisierung und zunehmend breiterem Zugang zu Fernreisen tendenziell zu (Schmolz et al. 2015). Während einige vektorvermittelte Infektionen, wie beispielsweise die Malaria, auch weit über Fachkreise hinaus bekannt sind, finden seltener, jedoch nicht minder gefährliche Erkrankungen, weniger Beachtung. So ist das Risiko für die Übertragung der Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) und Borreliose durch Zecken in Deutschland weitestgehend bekannt. Rickettsiosen, die auf dem gleichen Weg übertragen werden können, sind jedoch außerhalb der Reisemedizin wenig beachtet und werden kaum als Differentialdiagnosen bei Erkrankungen nach Zeckenstichen in Betracht bezogen. Jedoch sind Rickettsien weltweit vorhandene Krankheitserreger, welche bis heute für schwere Krankheitsbilder sorgen (Parola et al. 2013). In der Vergangenheit waren sie für Epidemien mit relevanten Mortalitätsraten verantwortlich (Philippsthal 1918).

1.1 Rickettsien – Historie und Klassifikation

Rickettsien sind gramnegative Bakterien. Häufig kommen sie als Kokken oder Stäbchen vor, sind jedoch insgesamt polymorphe Organismen. Sie überleben und vermehren sich obligat intrazellulär in eukaryotischen Wirtszellen (Whitman 2011).

Die Erstbeschreibung erfolgte 1908 durch Howard Taylor Ricketts, einen US-amerikanischen Mikrobiologen und Pathologen. Er starb im Zuge seiner Forschung 1910 an Läuse-Fleckfieber, als er einen Ausbruch in Mexico-Stadt untersuchte (Gross und Schäfer 2011). Von damals bis heute wurden viele neue Erkenntnisse über diese Bakterien und ihre Rolle als Krankheitserreger gewonnen. Die taxonomische Zuordnung hat sich nach zahlreichen neuen Forschungsergebnissen im Laufe der Jahre des Öfteren gewandelt. Aktuell werden Rickettsien in die Klasse der *Alphaproteobakterien* der Ordnung *Rickettsiales* eingeordnet. Innerhalb der Ordnung werden Rickettsien in drei Gruppen eingeteilt. Dies entspringt den unterschiedlichen Eigenschaften als Humanpathogene, sowie den genetischen Unterschieden der jeweiligen Spezies. Es werden die Zeckenstichfieber-Gruppe, die Fleckfieber-Gruppe und die Ahnen-Gruppe unterschieden. Abbildung 1 zeigt den phylogenetischen Stammbaum der *Rickettsiales* basierend auf den bekannten Sequenzen des 16S rDNA Gens (Whitman 2011).

GENUS I. RICKETTSIA

97

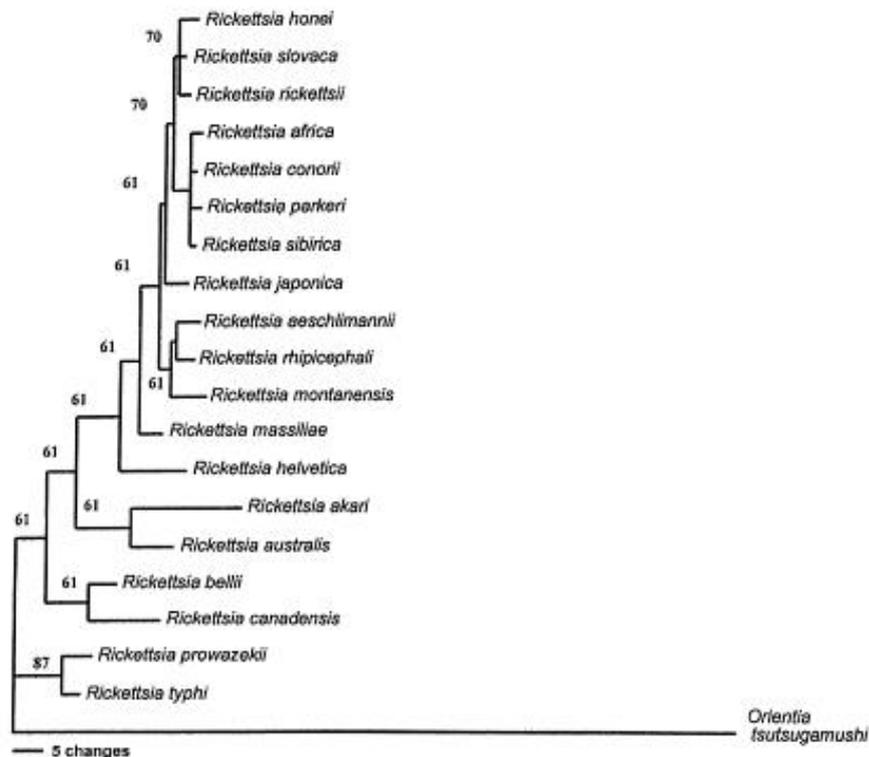


FIGURE BXII.α.35. Phylogenetic relationships of the organisms in the Family *Rickettsiaceae* based on the DNA sequences of the 16S rRNA genes (GenBank accession numbers: *R. aeschlimannii*, RAU74757; *R. africae*, R1RRGDA; *R. akari*, RAU12458; *R. australis*, RAU17644; *R. bellii*, RBU11014; *R. canadensis*, RCU15162; *R. conorii*, R1RRGDH; *R. helvetica*, R1RRGDK; *R. honei*, AF060705; *R. japonica*, R1RRGDI; *R. massiliae*, R1RRGDI; *R. montanensis*, R1RRGDN; *R. parkeri*, R1RRRDA; *R. prowazekii*, R1RRGSA; *R. rhipicephali*, R1RRGDO; *R. rickettsii*, R1RRGDP; *R. sibirica*, R1RRS16SRG; *R. slovacica*, R1RRGDX; *R. typhi*, R1RRGDU; *O. tsutsugamushi*, R1RRTKP16B). The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs. The numbers on the branch indicate the bootstrap values.

Abbildung 1 Genus *Rickettsia* (Whitman 2011)

Rickettsien werden durch Vektoren wie Läuse, Flöhe oder Zecken auf den Menschen übertragen. In der Vergangenheit gab es in Mitteleuropa vor allem unter schlechten hygienischen Bedingungen, wie z.B. während der napoleonischen Kriege, große Epidemien von Läuse-Fleckfieber (Raoult et al. 2006). Während in diesen Zeiten vor allem das Epidemische Fleckfieber und das Endemische Fleckfieber oder Flecktyphus vorkamen und dementsprechend Läuse und Flöhe die entscheidenden Vektoren für diese Infektionskrankheiten waren, rücken heutzutage die Zecken als Überträger in den Vordergrund.

1.2 Rickettsiosen – Infektion und klinische Symptome

Für die Übertragung des Erregers sind zwei verschiedene Infektionswege beschrieben. Erstens das „Einreiben“ der Erreger aus Faeces von Arthropoden beim Kratzen nach Stichen, welches die Zellinvasion in die Epithelzellen der Haut ermöglicht. Dort erfolgt die Vermehrung und in der Folge eine weitere Erregerausbreitung im Körper. Zweitens eine direkte Inokulation von erregerhaltigem Speichel des Vektors in die Blutbahn und Invasion in kapilläre Epithelien an der Einstichstelle. Zweiteres ist der wahrscheinliche Übertragungsweg bei Zeckenstichen (Walker und Ismail 2008).

In Nordamerika und Afrika sowie im Mittelmeerraum sind einige relevant humanpathogene, von Zecken übertragene Rickettsien-Arten endemisch, welche zum Teil schwere Krankheitsbilder hervorrufen. Als Beispiele sind *Rickettsia rickettsii* (Rocky Mountain spotted fever), *Rickettsia africae* (African tick bite fever) und *Rickettsia conorii* (Mittelmeerfleckfieber) zu nennen.

Typische Symptome einer Rickettsieninfektion sind Hautausschläge und Fieber. In einigen Fällen kann sich bei einer Infektion ein lebensbedrohliches Krankheitsbild im Sinne eines septischen Schocks entwickeln. An der Einstichstelle zeigt sich, abhängig von der Rickettsien-Spezies, häufig auch das typische Bild eines „Eschar“, wie in Abbildung 2 zu sehen. Der Eschar tritt, teilweise auch abhängig vom Vektor, in typischer Lokalisation, zum Beispiel an der Kopfhaut oder den Unterschenkeln auf.



Abbildung 2 Eschar (Faccini-Martínez et al. 2014)

1.3 Diagnostik

Diagnostische Methoden zum Nachweis rickettsialer Erkrankungen werden nur in wenigen spezialisierten Laboratorien angeboten und beschränken sich in der Regel auf den serologischen und molekularbiologischen Nachweis. Eine Erregeranzucht in vitro gestaltet sich aufgrund der Biologie dieser Erreger schwierig.

1.3.1 Kulturverfahren

Erste Erfolge gelangen in der Vergangenheit bei der Infektion von embryonierten Hühnereiern (Cox 1938).

Inzwischen ist die Anzucht in Zellkultur möglich, jedoch spezialisierten Laboratorien vorbehalten. Die Techniken werden stetig verfeinert. Insbesondere bei humanen Krankheitsfällen ist die Erregerisolierung und -vermehrung aus Patientematerial schwierig. Hier sind Biopsien aus dem Eschar oder den Hauteffloreszenzen das Material mit den besten Erfolgsaussichten. Entscheidend ist auch eine Entnahme im frühen Krankheitsstadium und möglichst vor Beginn einer antibiotischen Therapie (Dobler und Wölfel 2009).

1.3.2 PCR-Nachweis

Verschiedene konventionelle PCR-Nachweismethoden wurden über mehrere Jahre entwickelt, jedoch ist hier die Sensitivität für Patientenproben insgesamt gering (Portillo et al. 2017). Aufgrund der intrazellulären Vermehrung des Erregers ist ein direkter Nachweis des Erregers aus Blutproben erschwert. Am meisten Erfolg zeigte bisher im Vergleich ein molekularbiologischer Nachweis aus Hautbiopsien unmittelbar um den Einstich bzw. die Effloreszenz (Brouqui et al. 2004).

Einen schnellen Nachweis von Rickettsien allgemein, auch bei geringerer Erregerdichte, bringt die Real-Time-PCR (Wölfel et al. 2008; John Stenos et al. 2005). Zur Differenzierung der jeweiligen Spezies sind jedoch weiterhin aufwendige Methoden nötig, unter anderem die Sequenzierung bestimmter Gene von Rickettsien (Luce-Fedrow et al. 2015).

1.3.3 Antikörpernachweise

Serologische Antikörpernachweise sind bei langer Latenz der Immunantwort zum Stichereignis, oft auch bei bereits bestehenden Symptomen, noch negativ.

Die Weil-Felix Reaktion war die erste Nachweismethode für Rickettsien, ist aber aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität inzwischen obsolet (Cox und Tadi 2022).

Indirekte Immunfluoreszenz ist eine Nachweistechnik mit hoher Sensitivität bezüglich des Nachweises von Rickettsien (Philip et al. 1976). Bei hoher Kreuzreaktivität innerhalb der jeweiligen Rickettsien-Gruppen kann jedoch die Identifizierung der genauen Rickettsien-Spezies erschwert oder ohne Erfolg sein.

1.4 Krankheitsverlauf und Therapie

In Deutschland gibt es für die bisher in Zecken nachgewiesenen Rickettsien-Spezies wenig Fallbeschreibungen von akuten Rickettsiosen und keine Dokumentation von schweren Verläufen. Es ist jedoch von einer nicht geringen Dunkelziffer an Erkrankungen auszugehen, da subakute Verläufe oft nicht diagnostiziert werden (Dobler und Wölfel 2009).

In Deutschland zeigt sich bei vor Ort erworbenen Rickettsiosen meist ein subakuter, selbstlimitierender Krankheitsverlauf. Risikofaktoren für einen komplizierten Verlauf bei den hier vorkommenden Rickettsien konnten bisher nicht identifiziert werden. Die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Rickettsien-Spezies ist bisher nur teilweise erforscht. So wurden in den letzten Jahren mehrere Rickettsien, die bisher als apathogen für Menschen galten, mit humanen Erkrankungsfällen in Verbindung gebracht (Parola et al. 2005).

Entscheidend für eine erfolgreiche Therapie, gerade bei komplizierten, schweren Verläufen mit möglichem letalem Ausgang, ist eine frühzeitige antibiotische Therapie mit Tetracyclinen, bevorzugt Doxycyclin. Im einzelnen Erkrankungsfall ist eine Prognose oft problematisch, da wie zuvor beschrieben, ein konkreter diagnostischer Nachweis einer Spezies im frühen Stadium einer Erkrankung oft nicht möglich ist.

1.5 Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe in Deutschland und ihre Vektoren

Bisher wurden für Deutschland das Vorkommen acht verschiedener Rickettsien-Spezies in Zecken beschrieben. Die Verteilung der Orte, an denen die jeweiligen Spezies nachgewiesen wurden, ist in der folgenden Grafik (Abbildung 3) dargestellt.



Abbildung 3 Nachweise von Rickettsien in Deutschland

(Reháček et al. 1977; Simser et al. 2002; Hartelt et al. 2004; Wölfel et al. 2006; Pichon et al. 2006; Dautel et al. 2006; Silaghi et al. 2008; Dobler et al. 2009; Dobler und Wölfel 2009; Pluta et al. 2009; Parola et al. 2009; Franke et al. 2010; Rieg et al. 2011; Schorn et al. 2011; Silaghi et al. 2011; Hildebrandt et al. 2011; Wimbauer et al. 2022)

Verschiedenen Zecken-Arten dienen hier als bevorzugte Vektoren. In verschiedenen Studien wurden zudem unterschiedliche Prävalenzen der Pathogene in

ihren Vektoren in Deutschland festgestellt. Eine Übersicht ist in Tabelle 1 zu finden.

Rickettsien-Arten	Vektor	Durchschnittliche Prävalenz im Vektor in Deutschland
<i>R. helvetica</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	3,5% - 44,8%
<i>R. monacensis</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	0,6% - 0,77%
<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentor marginatus</i> und <i>Dermacentor reticulatus</i>	0,75% - 13,3%
<i>R. raoultii</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	21% - 56,7%
<i>R. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> <i>Ixodes ricinus</i>	9% - 100% 0,4%
<i>R. massiliae</i>	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	1,7% kein Nachweis in Deutschland
<i>R. aeschlimanii</i>	<i>Hyalomma marginatum</i> (nicht endemisch, einzeln eingeschleppte Exemplare)	50%
<i>Cand. R. vini</i>	<i>Ixodes aboricola</i> , <i>Ixodes lividus</i>	bisher keine Daten

Tabelle 1 Rickettsien, ihre Vektoren und Prävalenz im Vektor in Deutschland

(Simser et al. 2002; Hartelt et al. 2004; Wölfel et al. 2006; Pichon et al. 2006; Dautel et al. 2006; Gilles et al. 2008; Silaghi et al. 2008; Dobler et al. 2009; Dobler und Wölfel 2009; Pluta et al. 2009; Franke et al. 2010; Schorn et al. 2011; Silaghi et al. 2011; Hildebrandt et al. 2011; Wimbauer et al. 2022)

1.5.1 *Rickettsia helvetica*

Rickettsia helvetica wurde in verschiedenen Gebieten in ganz Deutschland mehrfach aus Zecken nachgewiesen (Hartelt et al. 2004).

Bevorzugter Vektor ist *Ixodes (I.) ricinus*. *R. helvetica* wurde in Kroatien, Belgien und den Niederlanden aber auch schon in *Dermacentor (D.) reticulatus* gefunden (Dobec et al. 2009; Sprong et al. 2019).

In Schweden und Frankreich gibt es Fallbeschreibungen, bei denen *R. helvetica* mit Fieber, Septikämie, subakuter Meningitis und chronischer Perimyokarditis in Verbindung gebracht wird (Fournier et al. 2000). Ein Nachweis von *R. helvetica* gelang aus dem Liquor einer Patientin mit akuter Meningitis (Nilsson et al. 2010). In Deutschland sind bisher trotz der weiten Verbreitung in *Ixodes*-Zecken, der teilweise sehr hohen Durchseuchung in Zecken (Blazejak et al. 2017) und dem Nachweis auch in Kleinsäugern (Schex et al. 2011; Fischer et al. 2018), keine klinischen Fälle in Zusammenhang mit *R. helvetica* beschrieben worden.

1.5.2 *Rickettsia monacensis*

Rickettsia monacensis wurde in Deutschland erstmalig in Zecken aus dem Englischen Garten in München nachgewiesen (Simser et al. 2002) und der Erreger 2009 erstmalig aus Zecken isoliert (Dobler et al. 2009). Auch diese Spezies kommt an mehreren Orten in Deutschland nachweislich vor, allerdings ist die Prävalenz in *Ixodes*-Zecken in Deutschland für diese Art mit 0,7% deutlich geringer als für *R. helvetica* (Silaghi et al. 2008; Franke et al. 2010; Schorn et al. 2011). In Deutschland wurden bisher keine Erkrankungsfälle beschrieben, die mit *R. monacensis* in Verbindung gebracht werden können. In Spanien wurde *R. monacensis* bei zwei Patienten mit dem Mittelmeerfleckfieber ähnlichen Symptomen nachgewiesen (Jado et al. 2007). Hier wurde in einer anderen Studie auch eine deutlich höhere Prävalenz von *R. monacensis* in *I. ricinus* von 9,9% nachgewiesen (Márquez 2008). Ein ähnlicher Erkrankungsfall wurde auch in Italien beschrieben (Madeddu et al. 2012). Auch hier war der Anteil von *R. monacensis* in auf Rickettsien positiv getesteten Zecken deutlich höher als in ähnlichen Untersuchungen in Deutschland (Morganti et al. 2017). Möglicherweise kommt diese Art in Deutschland in zu geringer Zahl vor, um trotz der nachgewiesenen Humanpathogenität ein relevantes Erkrankungsrisiko darzustellen.

1.5.3 *Rickettsia slovaca*

Rickettsia slovaca war 1977 die erste Rickettsien-Spezies, die in Deutschland aus Zecken nachgewiesen wurde. Der Nachweis erfolgte aus *D. marginatus*, welche in Süddeutschland gesammelt wurden (Reháček et al. 1977). Dies gelang erneut 2009 aus Zecken, die im Rhein-Main-Gebiet gesammelt wurden (Pluta et al. 2009). Hier waren 0,75% der in Aschaffenburg gesammelten *D. marginatus* mit *R. slovaca* infiziert. In einer Studie mit Zecken aus dem Saarland, Bayern und

Sachsen wurde eine Prävalenz von 13% insgesamt in den untersuchten *D. marginatus* und *reticulatus* sowie *I. ricinus* beschrieben (Silaghi et al. 2011).

R. slovaca ist der Erreger für das als Tick-borne lymphadenitis (TIBOLA) oder auch Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy (DEBONEL) bekannte Krankheitsbild. In Spanien wurden einige klinische Fälle bei Menschen über mehrere Jahre dokumentiert (Ibarra et al. 2006). Auch in Rheinland-Pfalz (Deutschland) wurde 2009 ein Patientenfall beschrieben. *R. slovaca* konnte zwar nicht direkt aus Patientenmaterial nachgewiesen werden, jedoch aus einer Zecke, welche den Patienten 7 Tage vor Auftreten von typischen Symptomen gestochen hatte. Zusätzlich war bei dem Patienten die Serologie für Rickettsien der Zeckenbissfieber-Gruppe deutlich positiv, sodass von einer Infektion mit *R. slovaca* ausgegangen werden kann (Pluta et al. 2009). Ein typischer Fall mit Eschar im Bereich des Zeckenstiches am Hinterkopf sowie Fieber, Kopfschmerz und nuchaler Lymphadenopathie wurde 2011 bei einer Patientin in der Nähe von Freiburg beschrieben (Rieg et al. 2011).

1.5.4 *Rickettsia raoultii*

Rickettsia raoultii wurde 2008 als neue Spezies benannt und hier aus *Dermacentor*-Zecken in Russland und Frankreich isoliert (Mediannikov et al. 2008). Auch in Deutschland gab es mehrere Nachweise von *R. raoultii* aus Zecken in Sachsen, Sachsen-Anhalt, Brandenburg und Bayern mit Prävalenzen von 23% (Pluta et al. 2009) bis 56,7% (Silaghi et al. 2011) in *D. marginatus* und *reticulatus*.

R. raoultii ist ebenfalls ein Erreger der TIBOLA und DEBONEL verursacht, allerdings meist mit mildereren Verläufen als bei *R. slovaca*. Fallbeschreibungen existieren für Patienten aus Frankreich mit indirektem Nachweis, hier wurde *R. raoultii* aus Zecken nachgewiesen, die von erkrankten Patienten stammten, nicht jedoch aus Patientenmaterial (Parola et al. 2009). In Deutschland existiert wiederum keine Fallbeschreibung für eine Rickettsiose verursacht durch *R. raoultii*, trotz der hohen Prävalenz in *Dermacentor*-Zecken. Da in der Vergangenheit diese Zecken in Deutschland wenig verbreitet waren und selten Menschen befallen, könnte eine Übertragung von *R. raoultii* bisher sehr selten gewesen und resultierende Erkrankungen nicht erkannt worden sein. Möglicherweise ist nördlich der Alpen auch eine gering pathogene oder auch apathogene Variante von *R. raoultii* endemisch. Mit der seit einigen Jahren zunehmenden Verbreitung von *Dermacentor*-Zecken in Europa und auch in Deutschland könnte diese Rickettsien-Art zukünftig jedoch möglicherweise eine beachtenswerte Rolle als Humanpathogen einnehmen (Drehmann et al. 2020).

1.5.5 *Rickettsia felis*

Rickettsia felis wurde zuerst aus Flöhen isoliert und nutzt diese als primären Vektor (Gilles et al. 2008). In diesem Vektor sind sie weltweit zu finden.

In Japan und Brasilien wurde sie aus verschiedenen Zecken nachgewiesen (Pérez-Osorio et al. 2008). In Deutschland wurde *R. felis* ebenfalls aus *Ixodes ricinus* nachgewiesen (Dobler und Wölfel 2009).

R. felis verursacht ein Fleckfieber mit makulopapulösen Exanthen. Fallbeschreibungen für Erkrankungen von Menschen sind bisher nur in Zusammenhang mit Flohstichen, jedoch nicht mit Zecken beschrieben (Brouqui et al. 2007). Bei zwei Patienten aus Düsseldorf, bei welchen eine Erkrankung mit *R. felis* nachgewiesen wurde, könnte möglicherweise auch ein Zeckenstich als Ursache diskutiert werden, wahrscheinlicher ist hier jedoch wiederum ein Flohstich (Richter et al. 2002).

1.5.6 *Rickettsia aeschlimannii*

Rickettsia aeschlimannii wurde erstmals 1997 aus *Hyalomma marginatus* in Marokko nachgewiesen (Beati et al. 1997). Seitdem gab es mehrere Nachweise vor allem in Südeuropa und Nordafrika (Parola et al. 2005). Die Prävalenz von *R. aeschlimannii* in verschiedenen *Hyalomma*-Spezies wurde in verschiedenen Untersuchungen mit 8,5% - 9,2% in Nordafrika (Djebouh et al. 2012; Selmi et al. 2020) und 7,48% - 19,46% in Spanien (Fernández-Soto et al. 2009) angegeben.

2011 wurde der erstmalige Nachweis von *R. aeschlimannii* in einer *Hyalomma*-Zecke beschrieben, welche von einem in Deutschland gefangenen Vogel abgesammelt wurde (Rumer et al. 2011). Bisher kommen *Hyalomma*-Zecken in Deutschland nur als Reiseimporte vor, die Einschleppung durch Zugvögel ist jedoch ein weiterer Faktor, wie diese Art nach Deutschland gelangen kann. Saisonal können bei günstigen Klimabedingungen diese Zecken dann auch vor Ort überleben und sind damit potentieller Vektor von *R. aeschlimannii* in Deutschland. Von 35 im Jahr 2018 in Deutschland gesammelten *Hyalomma*-Zecken trugen in einer Studie 50% der Zecken *R. aeschlimannii* (Chitimia-Dobler et al. 2019). *R. aeschlimannii* verursacht eine Rickettsiose ähnlich dem Mittelmeerfleckfieber, meistens mit Escharbildung an der Stelle des Zeckenstiches. Der erste Patientenfall wurde in Frankreich bei einem Reisenden aus Marokko beschrieben (Raoult et al. 2002). In Deutschland existiert eine Fallbeschreibung aus dem Jahr 2019 für eine Erkrankung von einem Pferdehalter aus dem Raum Siegen (Nordrhein- Westfalen), welcher einen Stich von einer *Hyalomma*-Zecke erlitt

und folgend typische Symptome für ein Zecken-Fleckfieber zeigte. *R. aeschlimanii* konnte hier aus der Zecke, jedoch nicht aus Patientenmaterial nachgewiesen werden (Spiegel 2019).

1.5.7 *Rickettsia massiliae*

Rickettsia massiliae wurde in acht europäischen Ländern aus verschiedenen *Rhipicephalus*-Spezies und *I. ricinus* nachgewiesen (Parola et al. 2013). In Süddeutschland wurde 2004 einmalig eine *R. massiliae* ähnliche Rickettsien-Art aus *I. ricinus* nachgewiesen.

R. massiliae verursacht ein Krankheitsbild ähnlich dem Mittelmeerfleckfieber, das von *R. conorii* verursacht wird. Es gibt dazu Fallbeschreibungen aus Italien (Parola et al. 2005; Vitale et al. 2006). In Deutschland wurde noch kein Fall beschrieben, der als vor Ort erworben zu bewerten ist.

1.5.8 *Candidatus Rickettsia vini*

Candidatus (Cand.) Rickettsia vini wurde aus 2017 und 2018 von Vögeln in Hessen gesammelten *Ixodes*-Zecken nachgewiesen (Wimbauer et al. 2022). Diese Spezies wurde in Europa mehrfach in *Ixodes aboricola*-Zecken nachgewiesen (Novakova et al. 2015). Diese Zecke befällt bevorzugt Vögel. Eine mögliche Pathogenität von *Cand. R. vini* ist bisher nicht bekannt. Allerdings ist dieser Nachweis ein wichtiger Baustein im Verständnis der Ausbreitung von Rickettsien in Europa, da Zugvögel eine Rolle als Vehikel für infizierte Zecken spielen könnten.

1.5.9 Gesamtprävalenz von Rickettsien und Co-Infektionen

Neben den beschriebenen einzelnen spezifischen Nachweisen von Rickettsien aus Zecken in Deutschland wurden Prävalenzen von Rickettsien in Zecken ohne weitere Artspezifizierung von bis zu 52,5% beschrieben. Diese variieren zum Teil stark anhängig von Ort und Jahreszeit zu der die Zecken gesammelt wurden (May und Strube 2014).

Auch Co-Infektionen einer Zecke sowohl mit mehreren Rickettsien-Spezies als auch mit anderen humanpathogenen Erregern wie Babesien, Anaplasmen (Schorn et al. 2011) und Borrelien (Pichon et al. 2006) wurden beschrieben. Dies erhöht die Anzahl der möglichen Differentialdiagnosen bei Erkrankung nach Zeckenstich und macht eine differenzierte Diagnostik noch wichtiger.

1.6 Seroprävalenzen

Untersuchungen zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen Rickettsien bei Menschen und Tieren in Deutschland zeigten mehrfach positive Ergebnisse. Die Differenzierung zwischen den Arten ist hier jedoch schwierig, da eine hohe Kreuzreaktivität vorhanden ist.

Es konnte gezeigt werden, dass in Risikogruppen für Zeckenstiche wie Jägern und Forstarbeitern bis zu 55% der untersuchten Probanden Antikörper gegen Rickettsien ausgebildet hatten, auch wenn sie nicht erinnerlich oder bewusst nach Zeckenstichen erkrankt waren (Jansen et al. 2008; Wölfel et al. 2017). Zudem wurden entsprechende Antikörper auch bei Hunden (Wächter et al. 2015) und Kleinsäugetern (Schex et al. 2011) aus Deutschland nachgewiesen. Diese Seroprävalenzen sind ein deutlicher Hinweis auf ein relevantes Risiko für eine Erkrankung bei wahrscheinlichem Kontakt mit dem Erreger, insbesondere für Gruppen mit hohem Risiko für Zeckenstiche. Zudem wird hier deutlich, dass Rickettsiosen, gerade bei milden Verläufen, vermutlich häufig nicht diagnostiziert werden.

Es liegen insgesamt wenige Daten zu Vorkommen, Verbreitung und insbesondere klinischer Signifikanz der einzelnen Rickettsien-Arten in Deutschland vor. Weitere Untersuchungen sind also nötig, um das Wissen über Rickettsien und Rickettsiosen in Deutschland zu vervollständigen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Bisher existieren in Deutschland nur sehr begrenzt Daten zum Vorkommen von Rickettsien. Rickettsienisolate für weitergehende molekularbiologische und phänotypische Untersuchungen sind bisher überhaupt nicht verfügbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher:

1. Die Gewinnung von Daten zum Vorkommen von Rickettsien aus einer bisher nicht untersuchten Region in Südost-Bayern zur Ergänzung der bisherigen Daten in Bezug auf Vorkommen von Rickettsien in Deutschland.
2. Die Klärung des Vorkommens, der Häufigkeit und der Diversität von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe insgesamt in dieser Region.
3. Die Verbesserung der Fähigkeiten zur Detektion und Erregerisolation.
4. Die kulturelle Gewinnung von neuen Rickettsienisolaten aus Deutschland und aus dieser Region für weitere molekularbiologische Untersuchungen.
5. Die Klärung des Vorkommens einer einmalig im Jahr 2004 gefundenen Rickettsien-Spezies mit Ähnlichkeit zu *R. massiliae*.

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Standorte

Als Ort der Untersuchung wurde der Raum um Stützing im Landkreis Mühldorf am Inn gewählt. In einer hier von einer Katze abgesammelten *I. ricinus*-Zecke war eine Rickettsie nachgewiesen worden, welche genetisch als *R. massiliae* identifiziert wurde. Hieraus ergab sich als eine der Fragestellungen, ob diese, ansonsten nur im Mittelmeerraum vorkommende und von Zecken der Gattung *Rhipicephalus* übertragene Rickettsie autochton in diesem Gebiet zirkulieren könnte. Rund um diesen Ort wurden daher vier Waldgebiete, die als zeckengünstige Habitats identifiziert wurden (Laub- oder Mischwälder mit bodennaher Vegetation und reichlich Laubstreu, in denen sich sowohl Larven und Nymphen als auch adulte, wirtssuchende Zecken bevorzugt aufhalten) in der unmittelbaren Umgebung und ein weiteres in näherem Umkreis, nach Zugänglichkeit und Eignung zur Beprobung ausgewählt. Die Lage der Sammelgebiete ist in Abbildung 4 dargestellt, die genauen Standortkoordinaten können aus Tabelle 2 entnommen werden. In Abbildung 5 ist beispielhaft am Standort Hohenbuchbach die Beschaffenheit der Sammelorte zu sehen.

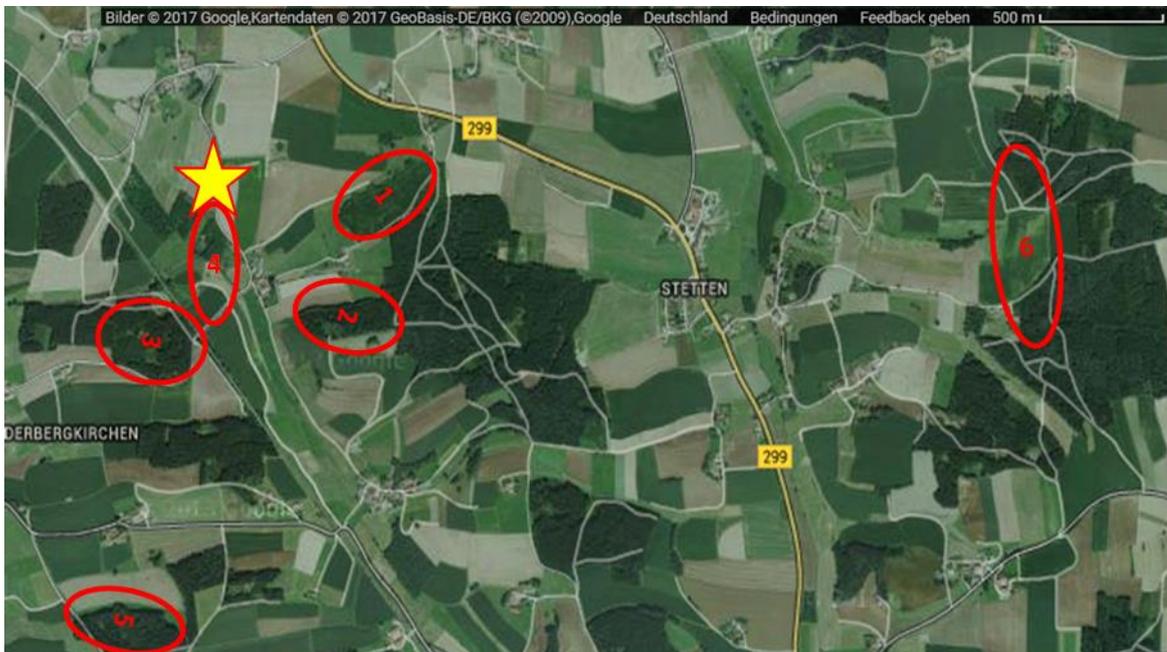


Abbildung 4 Lage der Standorte



Sammelort der 2004 gefundenen Rickettsien-Spezies mit Ähnlichkeit zu *R. massiliae*



Sammelorte 1 bis 6, Ortsnamen siehe Tabelle 2

Sammelorte	Sammeldatum	Koordinaten
1. Oberabing	02.07.2013	48.317736,12.539041
2. Stützing 1	10.07.2013	48.315025,12.537324
3. Hacken	10.07.2013	48.314882,12.525351
4. Stützing 2	04/06 2013	48.316024,12.53372
5. Hohenbuchbach	08.10.2016	48.314283,12.574317
6. Penning	16.09.2013	48.302737,12.529389

Tabelle 2 Standortkoordinaten



Abbildung 5 Standort Hohenbuchbach

2.2 Zecken sammeln

Im Zeitraum von April 2013 bis Oktober 2013 wurden die beschriebenen Waldgebiete unter Anwendung geeigneter Ausrüstung zum Schutz vor Zeckenstichen (hohe und feste Schuhe, ein Schutzanzug zum Einmalgebrauch, Abklebung der Verbindungstellen mit Klebeband, s. Abb. 6) mittels „Flagging“ beprobt. Die Zecken wurden mittels Zeckenfahnen (2 m² große Baumwolltücher) von der Vegetation abgestreift (dies wird als Flagging bezeichnet), danach mit Federstahlpinzetten vorsichtig abgesammelt und in ein 50 ml Probegefäß verbracht (siehe Abbildung 7). Zusätzlich wurden jeweils drei Grashalme vom Standort mit in den Behälter gelegt, um ein Austrocknen der Zecken während des Transports und der Lagerung zu verhindern. Die Lagerung der Zecken erfolgte bis zur weiteren Verarbeitung (maximal 5 Tage) bei 4 - 8°C in einem Laborkühlschrank.



Abbildung 6 Zeckenfahne und Schutzausrüstung



Abbildung 7 Absammeln von der Zeckenfahne

2.3 Laboruntersuchungen

Die Zecken wurden im Labor mit einem Mikroskop morphologisch bestimmt und nach Entwicklungsstadium sowie Geschlecht sortiert. Männchen und Weibchen sowie Nymphen bis Probe 531 wurden einzeln bearbeitet, ab Probe 531 wurden Nymphen und Larven in Pools zu maximal drei Tieren zusammengefasst. Zur späteren Homogenisierung wurden sie mit 1000 μl Gibco Minimal Essential Medium (Invitrogen) ohne Zusätze in Lysing Matrix A Tubes (MP Biomedical) verbracht. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Zecken in diesen Gefäßen bei -80°C gelagert.

2.3.1 Gewebhomogenisation

Die Zecken wurden homogenisiert und die Nukleinsäuren extrahiert. Es erfolgte danach eine sofortige PCR. In der Zwischenzeit wurden die Zeckenhomogenate bei 4°C gelagert. Nach dem PCR-Ergebnis wurden die positiven Zeckenhomogenate sofort in Zellkultur inokuliert. Dieses Prozedere war wichtig, da herausgefunden wurde, dass ein zwischenzeitliches Einfrieren der Homogenate zum Absterben der Rickettsien führt. Zur Homogenisierung wurde das FastPrep24 Instrument (MP Biomedical) verwendet. Mittels der eine Keramikugel und Sand enthaltenden Lysing Matrix A Tubes wurden alle Proben zweimal im halbgefrorenen Zustand bei 6 m/s für 30 s homogenisiert. Dabei wurden durch die enthaltene Matrix die Zecken zerkleinert und das Gewebe gleichmäßig im Medium homogenisiert. Danach wurden die Probengefäße für 5 min bei 5000 rpm (Heraeus Biofuge pico) zentrifugiert um Sand und Homogenatüberstand zu trennen. Die Proben wurden mittels Lagerung auf Eis vor und zwischen den Arbeitsschritten vor Überwärmung geschützt. 200 µl des Homogenatüberstands wurden sofort der weiteren Verarbeitung zugeführt, der verbleibende Anteil wurde bis zum Vorliegen der PCR-Ergebnisse im Laborkühlschrank bei 4 - 8°C gelagert.

2.3.2 Nukleinsäureextraktion

200 µl Homogenatüberstand pro Probe wurden in die Reaktionsplatten des Magna Pure LC-Instruments (Roche) pipettiert, in die zuvor pro Vertiefung 200 µl Lysepuffer aus dem Total-NA-Isolation Kit vorgelegt wurden. Während der Lysezeit von 10 min wurde der MagnaPure nach Herstellervorgaben, inklusive der Chemikalien des zugehörigen Kits, in der vorgegebenen Menge, vorbereitet. Anschließend wurde die Extraktion der Nukleinsäuren mittels des Total_NA external_lysis Protokoll gestartet. Hierbei werden die Zellen durch den Lysepuffer zerstört und durch einen Proteinverdau mit Proteinase K die Nukleinsäuren freigesetzt. Aufgrund ihrer Ladung binden diese an die, im nächsten Schritt zugefügten, magnetischen Partikel. Der gebildete Komplex wird mittels eines Magneten aus der Lösung entfernt und in mehreren Waschschrritten verbleibende Zellreste entfernt. Im letzten Schritt werden die Nukleinsäuren von den Partikeln getrennt und ausgewaschen. Auf diese Weise wurden 50 µl Eluat gewonnen, das in zwei Aliquots von 25 µl aufgeteilt wurde. Ein Aliquot wurde als Rückstellprobe bei -20°C gelagert, das zweite Aliquot sofort für die molekularbiologische Analyse verwendet.

2.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.3.1 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von definierten DNA-Abschnitten *in vitro*. Sie findet im Wesentlichen in drei Schritten statt, die mehrfach wiederholt werden. Im ersten Schritt wird bei hohen Temperaturen durch thermische Denaturierung die doppelsträngige DNA in Einzelstränge geteilt. Danach binden im sogenannten Annealing-Schritt die Primer an die durch die Oligonukleotidsequenz vorgegebenen Stellen auf den separierten Strängen. Dafür sind für jedes Primerpaar bestimmte Temperaturen (Annealing-Temperaturen) notwendig, um eine optimale Bindung zu erreichen. Die Elongation stellt den letzten Schritt dar. Hierbei wird durch eine DNA-Polymerase, ausgehend von den Primern, ein neuer DNA-Strang synthetisiert, bis dieser Vorgang durch die erneute Denaturierung unterbrochen wird. Die Leserichtung der Polymerase ist dabei immer vom 3' zum 5' Ende. Daher entstehen ab dem zweiten Zyklus die gewünschten DNA-Fragmente, die jeweils von den Primern begrenzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die konventionelle PCR, als auch die Methode der Real-Time-PCR verwendet.

Für die Anzahl der PCR-Analysen wurden zunächst die Volumina aller notwendigen Komponenten nach einem festgelegten Protokoll berechnet und zu einem ein Mastermix zusammen pipettiert. Anschließend erfolgte die Aufteilung in die Reaktionsgefäße und die Zugabe der jeweiligen Nukleinsäuren aus den Proben, beziehungsweise Probenpools. Als Positivkontrolle dienten für alle durchgeführten Reaktionen aufgereinigte Nukleinsäuren des Eigenisolats von *R. helvetica* AS819, als Negativkontrolle wurde nukleasefreies PCR-Wasser verwendet.

2.3.3.2 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-Time-PCR)

Die Real-Time-PCR arbeitet ebenfalls nach dem für die konventionelle PCR beschriebenen Prinzip zur Vervielfältigung von DNA. Zusätzlich kann hier jedoch die Menge der synthetisierten DNA nach jedem Zyklus durch ein gleichzeitig gemessenes Fluoreszenzsignal quantifiziert werden. Es stehen verschiedene Techniken zur Erzeugung dieses Signals zu Verfügung. Mit dieser Methode können mit kleineren Probevolumina gleichwertige Ergebnisse wie in der konventionellen PCR erzielt werden. Gleichzeitig ist die Wahrscheinlichkeit für eine Kontamination bei dieser Methode deutlich geringer.

2.3.3.3 TaqMan-Sonden

Die hier angewandten Real-Time-PCRs arbeiten mit sogenannten TaqMan-Sonden. Die Sonden bestehen aus einem zur Zielsequenz komplementären Oligonukleotid, mit einem Fluorophor am 5' Ende und einem Quencher-Molekül am 3' Ende, das die Fluoreszenz unterdrückt. Trifft die Taq-Polymerase in der Elongation auf das 5' Ende der angelagerten Sonde, wird durch ihre Exonukleaseaktivität das Fluorophor freigesetzt und entfernt sich somit vom Quencher. Bei Anregung mit Licht wird nun und in allen folgenden Zyklen ein Fluoreszenzsignal freigesetzt. Als positiv werden Proben mit einem sigmoidalen Verlauf (exponentieller Anstieg) und Überschreitung eines Schwellenwerts (threshold) gewertet.

Dies wird in dieser Arbeit über den CT-Wert beschrieben. CT steht für cycle-threshold und beschreibt den Teil der Fluoreszenzkurve und den Zeitpunkt (Zyklus), in dem das Signal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz überschreitet und ein exponentieller Anstieg der Kurve beginnt. Vergleicht man die CT-Werte zweier Proben, so kann man rückfolgern, in welcher zu Anfang mehr DNA vorhanden war, da besagter Schwellenwert schneller erreicht wird. Je niedriger also der CT-Wert, desto mehr Material war vor der Amplifikation in der Probe vorhanden, wenn die verglichenen Amplifikationen mit der gleichen Effektivität stattgefunden haben. Der Unterschied der CT-Werte zwischen zwei verglichenen Proben wird im Folgenden als Delta-CT bezeichnet, also der Unterschied, in welchem Zyklus die Kurve exponentiell ansteigt. Ein Beispiel ist in Abbildung 8 zu sehen.

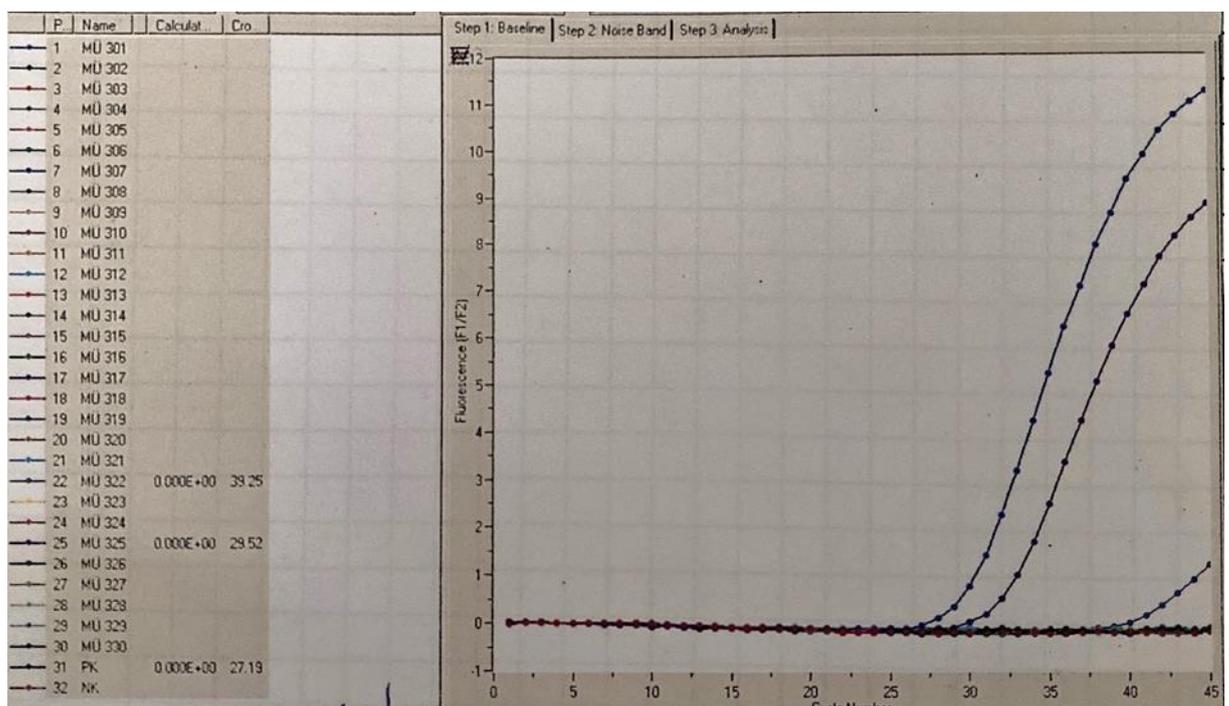


Abbildung 8 Beispiel Grafik Real-Time-PCR und CT-Werte

2.3.3.4 Pan-*Rickettsia*-Real-Time-PCR

Alle Proben wurden zunächst mittels einer hochsensitiven Pan-*Rickettsia*-Real-Time-PCR (Wölfel et al. 2008) an einem LightCycler 1.5 Instrument (Roche) auf *Rickettsien* DNA gescreent. Die Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde sind Tabelle 3 zu entnehmen. Die Zusammensetzung des Mastermixes für diese PCR ist in Tabelle 4 dargestellt. Tabelle 5 zeigt das verwendete Temperaturprofil sowie die Anzahl der Zyklen.

Gen	Primer/ Sonde	Oligonucleotidsequenz	Anzahl Basenpaare
gltA	PanRick_gltA_2_for	5'-ATAGGACAACCGTTTATTT-3'	19-mer
gltA	PanRick_gltA_2_rev	5'-CAAACATCATATGCAGAAA-3'	19-mer
gltA	PanRick_gltA_2_taq:	6FAM-CCTGATAATTCGTTAGATTTTA-CCG--TMR	25-mer

Tabelle 3 Pan-*Rickettsia* PCR (Wölfel et al. 2008)

Reagenz	Konzentration Gebrauchslösung	Endkonzentration	µl/ Reaktion
LC DNA Master Hybridization Probes	10x	1x	2
PCR-Wasser			8,5
PanRick glta2 for (forward Primer)	10 µmol/l	0,5 µmol/l	1
PanRick glta2 rev (reverse Primer)	10 µmol/l	0,5 µmol/l	1
Pan Rick glta2 taq	20 µmol/l	0,2 µmol/l	0,2
UGD Mix	100 U / 50 µl	0,5 U	0,25
MgCl	25 mmol/l	4 mmol/l	2,4
Gesamtvolumen Mastermix			15

Tabelle 4 Mastermixprotokoll Pan-*Rickettsia* PCR

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	Analysis Mode
UGD Schritt	40	1	00:10:00	20,0	none	none
Activation	95	1	00:10:00	20,0	none	none
Amplification	95	45	00:00:20	20,0	none	Quantification
	55		00:00:20	20,0	none	
	72		00:00:30	20,0	single	
Cooling	40	1	00:00:30	20,0	none	none

Tabelle 5 Thermoprofil Pan-*Rickettsia* PCR

Die in der oben genannten Pan-*Rickettsia* PCR positiven Proben wurden zur weiteren Differenzierung der vorliegenden Rickettsien-Spezies mit einer *Rickettsia helvetica* spezifischen Real-Time-PCR mittels LightCycler 1.5 untersucht. Die Sequenzen der verwendeten Primer und der Sonde hierfür sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Zusammensetzung des Mastermix PCR ist in Tabelle 7 dargestellt. Tabelle 8 zeigt das verwendete Temperaturprofil sowie die Anzahl der Zyklen.

Gen	Primer/ Sonde	Oligonukleotidsequenz	Anzahl Ba- senpaare
23S	Rick 23s rev	5´- gggATgggATCgTgTgTTTCAC	22-mer
23S	Rick 23s for	5´- gATAggTCgggTgTggAAgCAC	22-mer
23S	R helv P2	5´- 6FAM-AAggAgACACggAACACAgAACCGTAgCgTACACT-- TMR	35-mer

Tabelle 6 *Rickettsia helvetica* spezifische PCR (Wimbauer et al. 2022)

Reagenz	Konzentration Gebrauchslösung	Endkonzentration	µl/ Reaktion
LC DNA Master Hy- bridization Probes	10x	1x	2
PCR-Wasser			7,8
Rick 23s for (forward Primer)	10 µmol/l	0,5 µmol/l	1
Rick 23s rev (revers Primer)	10 µmol/l	0,5 µmol/l	1
P helvp2 taq	20 µmol/l	0,2 µmol/l	0,2
MgCl	25 mmol/l	5 mmol/l	3,0
Gesamtvolumen MM			15

Tabelle 7 Mastermixprotokoll *Rickettsia helvetica* spezifische PCR

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit	Slope (°C/s)	Acquisition Mode	Analysis Mode
Activation	95	1	00:10:00	20,0	none	none
Amplification	95	2	00:00:20	20,0	none	Quantification
	64		00:00:20	20,0	none	
	72		00:00:30	20,0	single	
Amplification	95	2	00:00:20	20,0	none	Quantification
	63		00:00:20	20,0	none	
	72		00:00:30	20,0	single	

Amplification	95 62 72	2	00:00:20 00:00:20 00:00:30	20,0 20,0 20,0	none none single	Quantification
Amplification	95 61 72	2	00:00:20 00:00:20 00:00:30	20,0 20,0 20,0	none none single	Quantification
Amplification	95 60 72	2	00:00:20 00:00:20 00:00:30	20,0 20,0 20,0	none none single	Quantification
Amplification	95 58 72	45	00:00:20 00:00:20 00:00:30	20,0 20,0 20,0	none none single	Quantification
Cooling	40	1	00:00:30	20,0	none	none

Tabelle 8 Thermoprofil *Rickettsia helvetica* spezifische PCR (Touch down Protokoll)

2.3.4 Multi Locus Sequence Typing

Zusätzlich wurde von allen positiven Proben ein Multi Locus Sequence Typing (MLST) mittels konventioneller PCR der Targets 16S rDNA, 23S-5S intergenic spacer des partiellen ompB Gens (Roux und Raoult 2000) und des partiellen OmpA-Gens (I+IV) (Fournier et.al.1998) durchgeführt. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Primer für die jeweiligen Gene sind Tabelle 9 zu entnehmen. Tabelle 10 zeigt exemplarisch für 18 Reaktionen die Zusammensetzung des Mastermixes für die konventionelle PCR des MLST. Die Tabellen 11 - 14 zeigen die Thermoprofile und die Anzahl der Zyklen einzeln für die jeweiligen Genorte.

Gen (partiell)	Primer/ Sonde (Sequenz)	Produktgröße (Basenpaare)	Autor
16S rDNA	Ric: 5'-TCTAGAACGAACGCTATCGGTAT-3' RicRt: 5'-TTTCATCGTTTAACGGCGTGGACT-3'	757	Nilsson et al. 1997
ompA I	RR-70: 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' cRR-701: 5'-GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3'	632	Fournier et al. 1998
ompA IV	RR-5125 5'-gCGGTTACTTTAGCCAAAGG-3' cRR-6013: 5'-TCTTCTGCGTTGCATTACCG-3'	889	Fournier et al. 1998

<i>ompB</i>	120-2788: 5'- AAACAATAATCAAGGTAAGT-3' 120-3599: 5'-TACTTCCGGTTACAGCAAAGT-3'	811	Roux und Raoul 2000
23S-5S intergenic spacer	Rick 23s for 5'- GATAGGTCGGGTGTGGAAGCAC-3' Rick 23s rev 5'- GGGATGGGATCGTGTGTTTCAC-3'	300-550 (Spezies-abhängig)	(Chitimia-Dobler et al. 2018)

Tabelle 9 Übersicht Genorte MLST

Reagenz	µl/ Reaktion	Volumen für 18 Reaktionen	Endkonzentration
PCR-Wasser	29,8	536,4	
dNTP Mix 10mM	1	18	0,2 mmol/l
PrimerRR	2,5	45	0,5 µmol/l
PrimercRR	2,5	45	0,5 µmol/l
Taq DNA Polymerase	0,2 (0,3)	3,6 (5,4)	1,5 U/50 µl
PCR-Puffer	5	90	
MgSO ₄	4 / 2,5 / 2	72	4 / 2,5 / 2 mmol/l
Gesamtvolumen MM	50	900	

Tabelle 10 Mastermixprotokoll für 18 Reaktionen konv PCR MLST

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Denaturierung	95	1	00:02:00
Denaturierung	95	2	00:00:30
Annealing Gradient	60		00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Denaturierung	95	2	00:00:30
Annealing Gradient	58		00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Denaturierung	95	2	00:00:30
Annealing Gradient	56		00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Denaturierung	95	2	00:00:30
Annealing Gradient	54		00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Denaturierung	95	2	00:00:30
Annealing Gradient	52		00:00:30
Elongation	68		00:00:60

Elongation			
Denaturierung	95		00:00:30
Annealing Gradient	50	35	00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Halten bei	68	-	00:10:00
Halten bei	12	-	00:00:00

Tabelle 11 Thermoprofil konventionelle PCR MLST **OmpB**

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Denaturierung	95	1	00:03:00
Denaturierung	95		00:00:20
Annealing	52(Fragment I)	45	00:00:30
	62,4 (Fragment IV)		00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Halten bei	68	-	00:07:00
Halten bei	12	-	-

Tabelle 12 Thermoprofil konventionelle PCR MLST **OmpA I und IV**

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Denaturierung	95	1	00:03:00
Denaturierung	94		00:00:30
Annealing	63	35	00:00:30
Elongation	68		00:02:00
Halten bei	68	-	00:07:00
Halten bei	12	-	-

Tabelle 13 Thermoprofil konventionelle PCR MLST **16S rDNA**

Parameter	Temperatur (°C)	Zyklen	Zeit
Denaturierung	95	1	00:03:00
Denaturierung	95		00:00:20
Annealing	57	45	00:00:30
Elongation	68		00:00:60
Halten bei	68	-	00:10:00
Halten bei	12	-	-

Tabelle 14 Thermoprofil konventionelle PCR MLST **5S-23S**

2.3.5 Gelelektrophorese

Die Produkte der konventionellen PCRs wurden in einem 1,5%igen Agarose-Gel getrennt. Dieses wurde zuvor aus 1,5 g Agarose gelöst, in 100 ml 1x TAE-Puffer und 5 µl GelRed hergestellt, für 1,5 min in der Mikrowelle erhitzt und anschließend zum Auskühlen in entsprechende Formen gegossen. Von jeder Probe wurden 5 µl mit 1 µl Ladepuffer gemischt und in die mittels eines Kammes herge-

stellten Taschen einpipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl von einem Molekulargewichtsmarker (100 Basenpaare) verwendet. Bei einer Spannung von 75 V wurde die Elektrophorese für 40 min durchgeführt und anschließend mit einer Kamera unter UV-Licht dokumentiert.

2.3.6 Aufreinigung des PCR-Produkts

Aus dem PCR-Produkt der im Gel positiven Proben wurde mittels QIAQuick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers die DNA manuell isoliert.

2.3.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach dem Sanger-Verfahren durch einen externen Vertragsnehmer (GATC Biotech AG) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden DNA-Einzelstrangfragmente synthetisiert, die sich jeweils nur um ein Basenpaar unterscheiden. Beginnend an einer bekannten Sequenz, startet die Synthese von einem radioaktiv markierten Primer aus. Durch den zufälligen Einbau eines modifizierten Didesoxyribonukleosid-Triphosphats (ddNTP), entsteht ein Kettenabbruch an verschiedenen Stellen. Dies wird in vier verschiedenen parallelen Ansätzen mit modifizierten ddNTPs für Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin durchgeführt. Nach Auftrennung der entstandenen, unterschiedlich großen Einzelstrang-Fragmenten aller vier Ansätze parallel durch eine Gelelektrophorese kann das Ergebnis aufgrund der radioaktiven Markierung auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Beginnend vom kürzesten Molekül hin zum längsten kann nun die Basen-Sequenz abgelesen werden (Sanger und Coulson 1975). Diese Methode wurde bis heute stetig weiterentwickelt. Anstatt der radioaktiven Markierung werden nun die ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert; die Auswertung erfolgt über eine Kapillarelektrophorese, sodass die Methode weniger Arbeitsschritte erfordert und automatisiert durchgeführt werden kann (Stranneheim und Lundeberg 2012).

2.3.8 Phylogenetische Analyse

Die gewonnenen Sequenzen wurden mit den Programmen BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) und MEGA 7.0 (Tamura und Nei 1993; Kumar et al. 2016) ausgewertet. Die phylogenetische Verwandtschaft wurde nach Ermittlung der höchsten Wahrscheinlichkeit mit der Maximum Likelihood Methode basierend auf dem Tamura-Nei Modell abgeleitet. In den Abbildungen 10 - 14 werden die plausibelsten Stammbäume, basierend auf den in dieser Arbeit gefundenen Sequenzdaten gezeigt. Die Prozentzahl der Stammbäume, bei denen die Sequenzen ein identisches Cluster gebildet haben, wird jeweils an den Abzweigungen als Zahl

dargestellt. Die Länge der jeweiligen Abzweigung stellt die Anzahl der Basensubstitutionen in der untersuchten Zielsequenz dar.

2.3.9 Zellkultur Rickettsien

Bei allen positiven Proben, die einen CT-Wert <35 in der Screening-PCR aufwiesen, erfolgte ein kultureller Anzuchtversuch in epithelialen Nierenzellen der grünen Meerkatze, Vero E6 Zellen (Vero C1008, European Cell Culture Collection).

Der Anzuchtversuch erfolgte parallel in kleinen Zellkulturflaschen mit 25 cm² Fläche (T25) und Shell Vials (SV). SV sind 4 ml Schraubröhrchengefäße, in die ein Deckgläschen eingelegt ist, auf denen der Zellrasen angezüchtet wird.

Die Zellen wurden am Vortag in einem Verhältnis von 1:2 eingesät und mit Minimal Essential Medium (MEM) + 1x Non Essential Amino Acids (NEAA) + 5% Fetales Kälberserum (FKS) über Nacht bei 37°C inkubiert, um einen für die Infektion optimalen, 80-90% dichten Zellrasen zu erhalten. Das Vorliegen der gewünschten Zelldichte und der Zellvitalität in allen T25 und SV wurde lichtmikroskopisch vor der weiteren Bearbeitung verifiziert. Vor der Infektion wurden Zellen mit zusatzfreiem MEM gewaschen. Zur Infektion wurde das Zecken-Homogenat 1:5 verdünnt. Je Probe wurden ein SV mit 200 µl und eine T25 mit 500 µl dieser Verdünnung, sowie eine Handling-Kontrolle mit 500 µl zusatzfreiem und erregerefreiem MEM inokuliert. Nach der Zugabe des Inokulats wurden die SV bei 800 x g für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, die Flaschen eine Stunde bei 32°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Infektionsmedium wieder abgenommen, die Zellen mit Anzuchtmedium (MEM + 1x NEAA + 3% FKS+ 1x Antibiotikum/Antimykotikum) gewaschen und anschließend die T25 mit 5 ml, die SV mit 1,5 ml frischem Anzuchtmedium aufgefüllt. Vom Zellkulturüberstand wurden je T25/SV 200 µl für einen Nullwert der Anzuchtkontrolle entnommen und bei -20°C eingelagert. Die weitere Inkubation der T25/SV erfolgte bei 32°C im Brutschrank. Die infizierten Zellen wurden täglich mittels Invers-Mikroskop auf Veränderungen (Entwicklung eines zytopathischen Effekts - CPE-, toxische Effekte, Alterungsprozesse) geprüft.

Aus den SV wurde nach 6 - 8 Tagen eine Passage in wie oben beschrieben hergestellten frischen Zellen in T25 Flaschen durchgeführt. Die Passage der infizierten Zellkulturen erfolgte nach folgendem Prinzip: Sowohl in den SV, als auch in den T25 wurde der Zellrasen mit Zellschabern vom Untergrund gelöst und im verbleibenden Zellmedium homogenisiert. Vom Homogenat wurden 200 µl für die Anzuchtkontrolle entnommen und bei -20°C eingelagert. Es wurden weitere 500 µl des Zellhomogenats entnommen und für die Infektion der neuen Zellkulturfla-

schen – in gleicher Weise, wie oben beschrieben – genutzt. Diesmal wurde Anzuchtmedium (MEM + 1x NEAA+ 3% FKS) ohne Zusatz von Antibiotikum/Antimykotikum hinzugefügt. 200 µl Zellkulturüberstand je T25/SV wurde unmittelbar wieder entnommen und bei -20°C eingelagert (Nullwert für Anzuchtkontrolle). Anschließend wurden die Zellen bei 32°C im Brutschrank inkubiert und auch die Passagen täglich auf mikroskopische Veränderungen überprüft.

Nach 7 - 14 Tagen Inkubation wurden die infizierten Zellen der 1. Passage geerntet. Hierfür wurde erneut der Zellrasen mittels Zellschaber vorsichtig mobilisiert und die Zellen vollständig im Medium suspendiert. Aus der Suspension wurden 200 µl entnommen und zum Zweck der Anzuchtkontrolle bei -20°C gelagert. Die Anzuchtkontrolle erfolgte mittels Real-Time-PCR durch Nachweis einer Abnahme des CT-Werts (>2). Hierfür wurde zuvor aus den eingelagerten Zellkulturüberständen der Tage 0, 7 und 14 der Anzucht, sowie der Passagen die rickettsiale DNA mittels Magna Pure extrahiert. Erfolgreich angezüchtete Rickettsien wurden aus den Passageflaschen mit den Zellen geerntet und nach Zugabe von 20% FKS in 1 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

Zur Ermittlung des Temperatur-Optimums der Anzucht von *R. monacensis* in Zellkultur wurden die Stämme AS 787, MÜ 635 und MÜ 612 in einem vergleichenden Ansatz, jeweils in Doppelbestimmung, bei 28°C, 32°C und 37°C nach der oben beschriebenen Methode angezüchtet. Der Erfolg der Anzucht wurde mittels Immunfluoreszenz und CT-Wert-Reduktion in der Real-Time-PCR ermittelt.

2.3.10 Infektionsnachweis mit Indirektem Immunfluoreszenz-Test (IIFT)

Bei einzelnen Proben (siehe Tabelle 21) erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Infektion mittels IIFT. Bei dieser Technik binden spezifische Antikörper an das nachzuweisende Substratantigen. Diese gebundenen Antikörper werden durch einen weiteren Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden ist, markiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop kann man nun auswerten, ob das gesuchte Antigen in der Probe vorhanden ist.

Dafür wurde 1 ml Zellsuspension für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Zelltemplate zur Deaktivierung der Rickettsien in 1 ml Phosphate buffered saline (PBS)-Puffer mit 4% Formalin resuspendiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut zentrifugiert und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Das resultierende Zellpellet wurde in 50 µl PBS resuspendiert. Davon wurden pro Probe 10 µl auf einen Objektträger gegeben, an der Luft getrocknet und anschließend mit einer 1:1 Aceton-Methanol Lösung bei -20°C

fixiert. Die so hergestellten Objektträger wurden an der Luft getrocknet und anschließend bei 4 - 8°C gelagert.

Dann wurden pro Feld 10 µl eines hoch positiven Patientenserums als Positivkontrolle in der Verdünnungsstufe 1:128 aufgetragen und der Objektträger 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschritt (einmal spülen, 3 mal 5 min in Küvette auf Schüttler) mit 0,2 % Tween (Euroimmun) in PBS. Von der 1:20 verdünnten Konjugatlösung (Dako, anti-human IgG, 0,4 g/l), der 0,5 µl Evans Blue (Biomeril) pro 100 µl zur Gegenfärbung zugesetzt wurde, wurden 10 µl je Testfeld aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde der oben erläuterte Waschschritt wiederholt. Anschließend wurden die Objektträger feucht mit Eindeckmedium (Dako) eingedeckt. Die Objektträger wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMS5000) durch zwei unabhängige Ableser ausgewertet.

3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 1084, morphologisch als *Ixodes ricinus* bestimmte Zecken gesammelt. Davon waren 134 Adulte (55 Männchen und 79 Weibchen), 941 Nymphen und 9 Larven. Die Sammelorte sowie das Zeckengeschlecht und -entwicklungsstadium sowie die Anzahl der Zecken in der Probe (Poolgröße) sind in Tabelle 15 dargestellt.

Probennummer	Sammelort	Zeckengeschlecht/ Entwicklungsstadium	Anzahl Zecken in Probe/Probenpool
1	Oberabing	W	1
2	Oberabing	M	1
3	Oberabing	N	1
4	Oberabing	N	1
5	Oberabing	W	1
6	Oberabing	N	1
7	Oberabing	W	1
8	Oberabing	N	1
9	Oberabing	M	1
10	Oberabing	W	1
11	Oberabing	M	1
12	Oberabing	N	1
13	Oberabing	N	1
14	Oberabing	M	1
15	Oberabing	N	1
16	Oberabing	N	1
17	Oberabing	N	1
18	Oberabing	N	1
19	Oberabing	N	1
20	Oberabing	N	1
21	Oberabing	N	1
22	Oberabing	M	1
23	Oberabing	N	1
24	Oberabing	N	1
25	Oberabing	N	1
26	Oberabing	N	1
27	Oberabing	N	1
28	Oberabing	N	1
29	Oberabing	N	1
30	Oberabing	N	1
31	Oberabing	N	1
32	Oberabing	N	1
33	Oberabing	N	1
34	Oberabing	N	1

35	Oberabing	N	1
36	Oberabing	N	1
37	Oberabing	N	1
38	Oberabing	N	1
39	Oberabing	N	1
40	Oberabing	N	1
41	Oberabing	N	1
42	Oberabing	N	1
43	Oberabing	N	1
44	Oberabing	N	1
45	Oberabing	N	1
46	Oberabing	N	1
47	Oberabing	N	1
48	Oberabing	N	1
49	Oberabing	N	1
50	Oberabing	N	1
51	Oberabing	N	1
52	Oberabing	N	1
53	Oberabing	N	1
54	Oberabing	N	1
55	Oberabing	W	1
56	Oberabing	N	1
57	Oberabing	W	1
58	Oberabing	N	1
59	Oberabing	N	1
60	Oberabing	W	1
61	Oberabing	W	1
62	Oberabing	M	1
63	Oberabing	N	1
64	Oberabing	W	1
65	Oberabing	M	1
66	Oberabing	N	1
67	Oberabing	N	1
68	Oberabing	N	1
69	Oberabing	W	1
70	Oberabing	N	1
71	Oberabing	M	1
72	Oberabing	N	1
73	Oberabing	N	1
74	Oberabing	N	1
75	Oberabing	W	1
76	Oberabing	N	1
77	Oberabing	N	1
78	Oberabing	N	1
79	Oberabing	N	1
80	Oberabing	N	1

81	Oberabing	N	1
82	Oberabing	N	1
83	Oberabing	N	1
84	Oberabing	N	1
85	Oberabing	N	1
86	Oberabing	N	1
87	Oberabing	W	1
88	Oberabing	W	1
89	Oberabing	M	1
90	Oberabing	N	1
91	Oberabing	N	1
92	Oberabing	N	1
93	Oberabing	N	1
94	Oberabing	M	1
95	Oberabing	N	1
96	Oberabing	M	1
97	Oberabing	N	1
98	Oberabing	N	1
99	Oberabing	N	1
100	Oberabing	N	1
101	Oberabing	N	1
102	Oberabing	N	1
103	Oberabing	N	1
104	Oberabing	N	1
105	Oberabing	N	1
106	Oberabing	N	1
107	Oberabing	N	1
108	Oberabing	N	1
109	Oberabing	N	1
110	Oberabing	N	1
111	Oberabing	N	1
112	Oberabing	N	1
113	Oberabing	N	1
114	Oberabing	N	1
115	Oberabing	N	1
116	Oberabing	N	1
117	Oberabing	N	1
118	Oberabing	N	1
119	Oberabing	N	1
120	Oberabing	N	1
121	Oberabing	N	1
122	Oberabing	N	1
123	Oberabing	N	1
124	Oberabing	N	1
125	Oberabing	N	1
126	Oberabing	N	1

127	Oberabing	W	1
128	Oberabing	N	1
129	Oberabing	N	1
130	Oberabing	N	1
131	Oberabing	N	1
132	Oberabing	N	1
133	Oberabing	N	1
134	Oberabing	N	1
135	Oberabing	N	1
136	Oberabing	N	1
137	Oberabing	N	1
138	Oberabing	N	1
139	Oberabing	N	1
140	Oberabing	N	1
141	Oberabing	N	1
142	Oberabing	N	1
143	Oberabing	N	1
144	Oberabing	N	1
145	Oberabing	W	1
146	Oberabing	M	1
147	Oberabing	W	1
148	Oberabing	N	1
149	Oberabing	N	1
150	Oberabing	N	1
151	Oberabing	W	1
152	Oberabing	N	1
153	Oberabing	M	1
154	Oberabing	N	1
155	Oberabing	N	1
156	Oberabing	N	1
157	Oberabing	N	1
158	Oberabing	N	1
159	Oberabing	N	1
160	Oberabing	N	1
161	Oberabing	N	1
162	Oberabing	N	1
163	Oberabing	N	1
164	Oberabing	W	1
165	Oberabing	N	1
166	Oberabing	N	1
167	Oberabing	N	1
168	Oberabing	N	1
169	Oberabing	M	1
170	Oberabing	W	1
171	Oberabing	W	1
172	Oberabing	N	1

173	Oberabing	N	1
174	Oberabing	N	1
175	Oberabing	N	1
176	Oberabing	N	1
177	Oberabing	N	1
178	Oberabing	N	1
179	Oberabing	N	1
180	Oberabing	N	1
181	Oberabing	N	1
182	Oberabing	N	1
183	Oberabing	N	1
184	Oberabing	N	1
185	Oberabing	N	1
186	Oberabing	N	1
187	Oberabing	N	1
188	Oberabing	N	1
189	Oberabing	N	1
190	Oberabing	N	1
191	Oberabing	N	1
192	Oberabing	N	1
193	Oberabing	N	1
194	Oberabing	N	1
195	Oberabing	N	1
196	Oberabing	N	1
197	Oberabing	N	1
198	Oberabing	N	1
199	Oberabing	N	1
200	Oberabing	N	1
201	Oberabing	N	1
202	Oberabing	N	1
203	Oberabing	N	1
204	Oberabing	N	1
205	Oberabing	N	1
206	Oberabing	N	1
207	Oberabing	N	1
208	Oberabing	N	1
209	Oberabing	N	1
210	Oberabing	N	1
211	Oberabing	N	1
212	Oberabing	N	1
213	Oberabing	N	1
214	Stützing1	W	1
215	Stützing1	W	1
216	Stützing1	N	1
217	Stützing1	N	1
218	Stützing1	N	1

219	Stützing1	N	1
220	Stützing1	N	1
221	Stützing1	N	1
222	Stützing1	W	1
223	Stützing1	N	1
224	Stützing1	N	1
225	Stützing1	M	1
226	Stützing1	M	1
227	Stützing1	N	1
228	Stützing1	N	1
229	Stützing1	N	1
230	Stützing1	N	1
231	Stützing1	N	1
232	Stützing1	N	1
233	Stützing1	N	1
234	Stützing1	N	1
235	Stützing1	N	1
236	Stützing1	M	1
237	Stützing1	N	1
238	Stützing1	W	1
239	Stützing1	M	1
240	Stützing1	N	1
241	Stützing1	M	1
242	Stützing1	M	1
243	Stützing1	N	1
244	Stützing1	N	1
245	Stützing1	N	1
246	Stützing1	N	1
247	Stützing1	N	1
248	Stützing1	M	1
249	Stützing1	N	1
250	Stützing1	N	1
251	Stützing1	N	1
252	Stützing1	N	1
253	Stützing1	N	1
254	Stützing1	N	1
255	Stützing1	N	1
256	Stützing1	N	1
257	Stützing1	N	1
258	Stützing1	N	1
259	Stützing1	N	1
260	Stützing1	N	1
261	Stützing1	N	1
262	Stützing1	N	1
263	Stützing1	N	1

264	Stützing1	N	1
265	Hacken	W	1
266	Hacken	W	1
267	Hacken	N	1
268	Hacken	N	1
269	Hacken	N	1
270	Hacken	N	1
271	Hacken	N	1
272	Hacken	N	1
273	Hacken	N	1
274	Hacken	N	1
275	Hacken	W	1
276	Hacken	W	1
277	Hacken	N	1
278	Hacken	N	1
279	Hacken	N	1
280	Hacken	N	1
281	Hacken	N	1
282	Hacken	N	1
283	Hacken	N	1
284	Hacken	N	1
285	Hacken	N	1
286	Hacken	N	1
287	Hacken	N	1
288	Hacken	M	1
289	Hacken	N	1
290	Hacken	M	1
291	Hacken	N	1
292	Hacken	N	1
293	Hacken	N	1
294	Hacken	N	1
295	Hacken	N	1
296	Hacken	N	1
297	Hacken	N	1
298	Hacken	M	1
299	Hacken	M	1
300	Hacken	N	1
301	Hacken	N	1
302	Hacken	N	1
303	Hacken	N	1
304	Hacken	N	1
305	Hacken	N	1
306	Hacken	N	1
307	Hacken	N	1
308	Hacken	N	1
309	Hacken	N	1

310	Hacken	N	1
311	Hacken	N	1
312	Hacken	N	1
313	Hacken	N	1
314	Hacken	N	1
315	Hacken	N	1
316	Hacken	N	1
317	Hacken	N	1
318	Hacken	N	1
319	Hacken	N	1
320	Hacken	N	1
321	Hacken	M	1
322	Hacken	N	1
323	Hacken	N	1
324	Hacken	N	1
325	Hacken	N	1
326	Hacken	N	1
327	Hacken	N	1
328	Hacken	N	1
329	Hacken	N	1
330	Hacken	N	1
331	Hacken	N	1
332	Hacken	N	1
333	Hacken	N	1
334	Hacken	N	1
335	Hacken	N	1
336	Hacken	N	1
337	Hacken	N	1
338	Hacken	N	1
339	Hacken	N	1
340	Hacken	W	1
341	Hacken	N	1
342	Hacken	W	1
343	Hacken	N	1
344	Hacken	N	1
345	Hacken	N	1
346	Hacken	N	1
347	Hacken	N	1
348	Hacken	N	1
349	Hacken	N	1
350	Hacken	N	1
351	Hacken	N	1
352	Hacken	N	1
353	Hacken	N	1
354	Hacken	N	1
355	Hacken	N	1

356	Hacken	M	1
357	Hacken	N	1
358	Hacken	N	1
359	Hacken	N	1
360	Hacken	N	1
361	Hacken	N	1
362	Hacken	N	1
363	Hacken	N	1
364	Hacken	N	1
365	Hacken	M	1
366	Hacken	N	1
367	Hacken	N	1
368	Hacken	N	1
369	Hacken	N	1
370	Hacken	N	1
371	Hacken	N	1
372	Hacken	N	1
373	Hacken	M	1
374	Hacken	N	1
375	Hacken	N	1
376	Hacken	W	1
377	Hacken	N	1
378	Hacken	N	1
379	Hacken	N	1
380	Hacken	N	1
381	Hacken	N	1
382	Hacken	N	1
383	Hacken	N	1
384	Hacken	N	1
385	Hacken	N	1
386	Hacken	N	1
387	Hacken	N	1
388	Hacken	N	1
389	Hacken	N	1
390	Hacken	N	1
391	Hacken	N	1
392	Hacken	M	1
393	Hacken	M	1
394	Hacken	N	1
395	Hacken	N	1
396	Hacken	N	1
397	Hacken	N	1
398	Hacken	N	1
399	Hacken	N	1
400	Hacken	L	1

401	Hacken	N	1
402	Hacken	N	1
403	Hacken	L	1
404	Hacken	N	1
405	Hacken	N	1
406	Hacken	N	1
407	Hacken	N	1
408	Hacken	N	1
409	Hacken	N	1
410	Hacken	M	1
411	Hacken	N	1
412	Hacken	N	1
413	Hacken	N	1
414	Hacken	N	1
415	Hacken	N	1
416	Hacken	N	1
417	Hacken	N	1
418	Hacken	N	1
419	Hacken	N	1
420	Hacken	N	1
421	Hacken	N	1
422	Hacken	N	1
423	Hacken	N	1
424	Hacken	N	1
425	Hacken	N	1
426	Hacken	N	1
427	Hacken	N	1
428	Hacken	N	1
429	Hacken	N	1
430	Hacken	N	1
431	Hacken	N	1
432	Hacken	N	1
433	Hacken	N	1
434	Hacken	N	1
435	Hacken	N	1
436	Hacken	N	1
437	Hacken	N	1
438	Hacken	N	1
439	Hacken	N	1
440	Hacken	N	1
441	Hacken	N	1
442	Hacken	N	1
443	Hacken	N	1
444	Hacken	N	1
445	Hacken	N	1

446	Hacken	N	1
447	Hacken	N	1
448	Hacken	N	1
449	Hacken	N	1
450	Hacken	N	1
451	Hacken	N	1
452	Hacken	N	1
453	Hacken	N	1
454	Hacken	N	1
455	Hacken	N	1
456	Hacken	W	1
457	Hacken	W	1
458	Hacken	N	1
459	Hacken	N	1
460	Hacken	N	1
461	Hacken	N	1
462	Hacken	N	1
463	Hacken	N	1
464	Hacken	N	1
465	Hacken	N	1
466	Hacken	N	1
467	Hacken	N	1
468	Hacken	N	1
469	Hacken	N	1
470	Hacken	N	1
471	Hacken	N	1
472	Hacken	N	1
473	Hacken	N	1
474	Hacken	N	1
475	Hacken	N	1
476	Hacken	N	1
477	Hacken	M	1
478	Hacken	N	1
479	Hacken	N	1
480	Hacken	N	1
481	Hacken	N	1
482	Hacken	N	1
483	Hacken	N	1
484	Hacken	N	1
485	Hacken	N	1
486	Hacken	N	1
487	Hacken	N	1
488	Hacken	N	1
489	Hacken	N	1
490	Hacken	N	1

491	Hacken	N	1
492	Hacken	N	1
493	Hacken	N	1
494	Hacken	N	1
495	Hacken	N	1
496	Hacken	N	1
497	Hacken	N	1
498	Hacken	N	1
499	Hacken	N	1
500	Hacken	N	1
501	Hacken	N	1
502	Hacken	N	1
503	Hacken	N	1
504	Hacken	N	1
505	Hacken	N	1
506	Stützing 2	W	1
507	Stützing 2	W	1
508	Stützing 2	W	1
509	Stützing 2	W	1
510	Stützing 2	W	1
511	Stützing 2	W	1
512	Stützing 2	W	1
513	Stützing 2	W	1
514	Stützing 2	W	1
515	Stützing 2	W	1
516	Stützing 2	W	1
517	Stützing 2	W	1
518	Stützing 2	W	1
519	Stützing 2	W	1
520	Stützing 2	W	1
521	Stützing 2	W	1
522	Stützing 2	W	1
523	Stützing 2	W	1
524	Stützing 2	N	1
525	Stützing 2	W	1
526	Stützing 2	W	1
527	Stützing 2	W	1
528	Stützing 2	W	1
529	Stützing 2	W	1
530	Stützing 2	W	1
531	Penning	N	3
532	Penning	N	3
533	Penning	N	3
534	Penning	N	3
535	Penning	N	3

536	Penning	N	3
537	Penning	N	3
538	Penning	W	1
539	Penning	N	3
540	Penning	N	3
541	Penning	N	3
542	Penning	N	3
543	Penning	M	1
544	Penning	M	1
545	Penning	W	1
546	Penning	W	1
547	Penning	M	1
548	Penning	N	3
549	Penning	N	3
550	Penning	N	3
551	Penning	M	1
552	Penning	N	3
553	Penning	N	3
554	Penning	N	3
555	Penning	N	3
556	Penning	M	1
557	Penning	N	3
558	Penning	W	1
559	Penning	N	3
560	Penning	N	3
561	Penning	N	3
562	Penning	N	3
563	Penning	N	3
564	Penning	N	3
565	Penning	M	1
566	Penning	N	3
567	Penning	N	3
568	Penning	N	3
569	Penning	N	3
570	Penning	N	3
571	Penning	M	1
572	Penning	N	3
573	Penning	N	3
574	Penning	N	3
575	Penning	W	1
576	Penning	N	3
577	Penning	N	3
578	Penning	N	3
579	Penning	W	1
580	Penning	W	1
581	Penning	N	3

582	Penning	M	1
583	Penning	M	1
584	Penning	N	3
585	Penning	N	3
586	Penning	N	3
587	Penning	N	3
588	Penning	N	3
589	Penning	N	3
590	Penning	N	3
591	Penning	N	3
592	Penning	N	3
593	Penning	N	3
594	Penning	N	3
595	Penning	N	3
596	Penning	N	3
597	Penning	M	1
598	Penning	N	3
599	Penning	N	3
600	Penning	M	1
601	Penning	N	3
602	Penning	M	1
603	Penning	N	3
604	Penning	N	3
605	Penning	N	3
606	Penning	N	3
607	Penning	W	1
608	Penning	N	3
609	Penning	N	3
610	Penning	M	1
611	Penning	M	1
612	Penning	N	3
613	Penning	N	3
614	Penning	N	3
615	Penning	W	1
616	Penning	N	3
617	Penning	N	3
618	Penning	N	3
619	Penning	N	3
620	Penning	N	3
621	Penning	N	3
622	Penning	N	3
623	Penning	N	3
624	Penning	M	1
625	Penning	N	3
626	Penning	N	3
627	Penning	N	3

628	Penning	N	3
629	Penning	N	3
630	Penning	N	3
631	Penning	N	3
632	Penning	N	3
633	Penning	N	3
634	Penning	N	3
635	Penning	N	3
636	Penning	N	3
637	Penning	N	3
638	Penning	N	3
639	Penning	N	3
640	Penning	N	3
641	Penning	N	3
642	Penning	N	3
643	Penning	N	3
644	Penning	W	1
645	Penning	W	1
646	Penning	W	1
647	Penning	M	1
648	Penning	N	3
649	Penning	N	3
650	Penning	N	3
651	Penning	N	3
652	Penning	N	3
653	Penning	N	3
654	Penning	N	3
655	Penning	N	3
656	Penning	W	1
657	Penning	M	1
658	Penning	N	3
659	Penning	N	3
660	Penning	N	3
661	Penning	N	3
662	Penning	N	3
663	Penning	N	3
664	Penning	N	3
665	Penning	N	3
666	Penning	N	3
667	Penning	N	3
668	Penning	N	3
669	Penning	N	3
670	Penning	N	3
671	Penning	N	3
672	Penning	N	3
673	Penning	N	3

674	Penning	N	3
675	Penning	N	3
676	Penning	N	3
677	Penning	N	3
678	Penning	N	3
679	Penning	N	3
680	Penning	N	3
681	Penning	N	3
682	Penning	N	3
683	Penning	L	2
684	Hohenbuchbach	N	3
685	Hohenbuchbach	M	1
686	Hohenbuchbach	M	1
687	Hohenbuchbach	N	3
688	Hohenbuchbach	N	3
689	Hohenbuchbach	N	3
690	Hohenbuchbach	N	3
691	Hohenbuchbach	W	1
692	Hohenbuchbach	W	1
693	Hohenbuchbach	N	3
694	Hohenbuchbach	N	3
695	Hohenbuchbach	N	3
696	Hohenbuchbach	N	3
697	Hohenbuchbach	W	1
698	Hohenbuchbach	M	1
699	Hohenbuchbach	N	3
700	Hohenbuchbach	L	3
701	Hohenbuchbach	N	3
702	Hohenbuchbach	N	3
703	Hohenbuchbach	W	1
704	Hohenbuchbach	N	3
705	Hohenbuchbach	N	3
706	Hohenbuchbach	M	1
707	Hohenbuchbach	N	3
708	Hohenbuchbach	W	1
709	Hohenbuchbach	L	2
710	Hohenbuchbach	N	3
711	Hohenbuchbach	N	3
712	Hohenbuchbach	N	3
713	Hohenbuchbach	N	3
714	Hohenbuchbach	N	3
715	Hohenbuchbach	M	1
716	Hohenbuchbach	N	3
717	Hohenbuchbach	N	3
718	Hohenbuchbach	N	3
719	Hohenbuchbach	N	3

720	Hohenbuchbach	N	3
721	Hohenbuchbach	N	3
722	Hohenbuchbach	N	3
723	Hohenbuchbach	N	3
724	Hohenbuchbach	N	3
725	Hohenbuchbach	W	1
726	Hohenbuchbach	N	3
727	Hohenbuchbach	N	3
728	Hohenbuchbach	N	3
729	Hohenbuchbach	N	3
730	Hohenbuchbach	N	3
731	Hohenbuchbach	W	1
732	Hohenbuchbach	N	3
733	Hohenbuchbach	N	3
734	Hohenbuchbach	W	1
735	Hohenbuchbach	N	3
736	Hohenbuchbach	N	3
737	Hohenbuchbach	N	3
738	Hohenbuchbach	N	3
739	Hohenbuchbach	N	3
740	Hohenbuchbach	W	1
741	Hohenbuchbach	N	3
742	Hohenbuchbach	N	3
743	Hohenbuchbach	N	3
744	Hohenbuchbach	N	3
745	Hohenbuchbach	L	2

Tabelle 15 Übersicht Mühldorfzecken

M: Männchen

W: Weibchen

N: Nymphe

L: Larve

3.1 PCR-Ergebnisse

Bei der Screening Untersuchung mittels der Pan-*Rickettsia*-PCR wurden 59 Proben als positiv bestimmt. Tabelle 16 zeigt die Ergebnisse und die entsprechenden CT-Werte.

Nummer	PanRick-PCR	CT
34	positiv	34,83
73	positiv	29,36
85	positiv	33,14
99	positiv	32,12
130	positiv	39,18
139	positiv	37,95
140	positiv	36,61
144	positiv	38,69
161	fraglich	42,28
173	positiv	30,72
231	schwach positiv	40,02
233	positiv	28,82
243	positiv	31,7
256	positiv	30,45
258	positiv	31,27
262	schwach positiv	40,74
322	schwach positiv	39,25
325	positiv	29,52
348	positiv	29,88
429	positiv	27,74
460	schwach positiv	43,21
471	positiv	28,45
505	positiv	28,73
531	positiv	30,23
533	positiv	27,35
534	positiv	37,98
535	positiv	28,12

541	positiv	35,96
550	schwach positiv	40,16
552	positiv	29,8
566	positiv	27,19
588	positiv	31,87
601	positiv	29,85
602	positiv	24,58
611	positiv	27,1
612	positiv	28,91
617	positiv	27,52
620	positiv	28,62
635	positiv	29,07
639	positiv	28,96
661	positiv	29,83
662	positiv	37,28
663	positiv	28,81
666	positiv	38,88
667	positiv	38,92
668	positiv	38,84
670	schwach positiv	39,61
673	schwach positiv	39,35
676	positiv	38,9
678	positiv	29,19
682	positiv	38,6
684	positiv	26,67
697	positiv	37,27
704	positiv	28,67
718	positiv	28,44

724	schwach positiv	39,5
726	positiv	29,96
729	positiv	29,58
739	positiv	25,91

Tabelle 16 positive Ergebnisse Pan *Rickettsia* PCR (PanRickPCR)

Schwach positiv: CT>39

Fraglich: sigmoidaler, aber flacher Kurvenverlauf

Bei der folgenden Untersuchung dieser 59 Proben oder Probenpools mittels der *R. helvetica* spezifischen Real-Time-PCR wurden 36 Zecken (Pools) positiv und 23 Zecken (Pools) negativ bestimmt. In Tabelle 17 sind hier ebenfalls die Ergebnisse und die CT-Werte zusammengefasst

Nummer	<i>R. helvetica</i> spez. - PCR	CT
34	positiv	33,87
73	positiv	30,2
85	positiv	37,07
99	positiv	32,74
130	positiv	31,94
139	positiv	34,49
140	positiv	32,41
144	positiv	22,88
161	negativ	
173	positiv	29,26
231	negativ	
233	positiv	27,71
243	positiv	28,52
256	positiv	27,79
258	positiv	28,61
262	negativ	

322	negativ	
325	positiv	29,11
348	negativ	
429	positiv	27,95
460	negativ	
471	positiv	27,74
505	positiv	28,33
531	negativ	
533	positiv	27,66
534	negativ	
535	positiv	27,99
541	negativ	
550	negativ	
552	positiv	29,73
566	positiv	26,92
588	negativ	
601	positiv	28,96
602	positiv	25,58
611	positiv	26,89
612	negativ	
617	positiv	27,78
620	positiv	28,81
635	negativ	
639	positiv	30,68
661	positiv	27,77
662	negativ	
663	positiv	25,82
666	negativ	

667	negativ	
668	negativ	
670	negativ	
673	negativ	
676	negativ	
678	positiv	27,96
682	negativ	
684	positiv	26,52
697	negativ	
704	positiv	28,41
718	positiv	26,97
724	negativ	
726	positiv	28,32
729	positiv	27,43
739	positiv	24,41

Tabelle 17 Ergebnisse *Rickettsia helvetica* spezifische PCR

Die in der *Rickettsia helvetica* spezifischen PCR negativ bestimmten Proben/Probenpools wurden mittels MLST in der Folge in 5 Fällen als *Rickettsia monacensis* identifiziert. Bei den restlichen 18 Proben/Probenpools war eine weitergehende Identifikation der Rickettsien-Spezies nicht erfolgreich. Die Ergebnisse des MLST sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

	ompA1	ompAIV	ompB	16S	23S
34	nd	neg	neg	HELV	neg
73	nd	HELV	neg	neg	neg
85	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
99	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
130	nd	neg	HELV	neg	HELV
139	nd	neg	HELV	HELV	HELV
140	nd	neg	HELV	HELV	HELV
144	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
161	nd	nd	nd	nd	nd

173	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
231	nd	nd	nd	nd	nd
233	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
243	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
256	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
258	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
262	nd	nd	nd	nd	nd
322	nd	nd	nd	nd	nd
325	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
348	MON	MON	MON	MON	MON
429	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
460	nd	nd	nd	nd	nd
471	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
505	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
527	nd	nd	nd	nd	nd
531	MON	MON	MON	MON	MON
533	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
534	nd	nd	nd	nd	nd
535	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
541	nd	nd	nd	nd	neg
550	nd	nd	nd	nd	nd
552	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
566	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
588	MON	MON	MON	MON	MON
601	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
602	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
611	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
612	MON	MON	MON	MON	MON
617	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
620	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
635	MON	nd	MON	MON	MON
639	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
661	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
662	nd	nd	nd	nd	nd
663	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
666	nd	nd	nd	nd	nd
667	nd	nd	nd	nd	nd
668	nd	nd	nd	nd	nd
670	nd	nd	nd	nd	nd
673	nd	nd	nd	nd	nd
676	nd	nd	nd	nd	nd
678	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
682	nd	nd	nd	nd	nd

684	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
697	nd	nd	nd	nd	nd
704	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
718	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
724	nd	nd	nd	nd	nd
726	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
729	nd	HELV	HELV	HELV	HELV
739	nd	HELV	HELV	HELV	HELV

Tabelle 18 Ergebnisse MLST

HELV: *R. helvetica*

MON: *R. monacensis*

nd: PCR nicht durchgeführt

neg: PCR negativ

Abbildung 9 zeigt die Verteilung der Rickettsien-Spezies in den jeweiligen Sammelorten. Da nicht jede Zecke einzeln untersucht wurde, sondern die Proben in Pools aus 1 - 3 Zecken zusammengefasst wurden, ist das Ergebnis als minimale Infektionsrate (MIR) beschrieben. Bei positiven Pools wird hier von minimal einer positiven Zecke pro Pool ausgegangen. Die resultierenden minimalen Infektionsraten, bezogen auf die unterschiedlichen Sammelorte, sind in Tabelle 19 dargestellt.

■ *R. helvetica* ■ *R. monacensis* ■ *Rickettsia spp.*



Abbildung 9 Verteilung der nachgewiesenen Rickettsien-Spezies in den Sammelorten

Site	Ticks (n)	Rickettsia- pos. (MIR)	<i>R. helvetica</i> (MIR)	<i>R. monacensis</i> (MIR)	Ndiff (MIR)
1	213	9 (4,2%)	9 (4,2%)	0 (0%)	0 (0%)
2	51	6 (11,7%)	4 (7,8%)	0 (0%)	2 (3,9%)
3	241	7 (2,9%)	4 (1,6%)	1 (0,4%)	2 (0,8%)
4	25	1 (4,0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4,0%)
5	398	28 (7,0%)	13 (3,2%)	4 (1,0%)	11 (2,7%)
6	156	8 (5,1%)	6 (3,8%)	0 (0%)	2 (1,3%)
Gesamt	1084	59 (5,4%)	36 (3,32%)	5 (0,46%)	18 (1,66%)

Tabelle 19 Minimal Infektionsrate (MIR)

Bei den zugeordneten Proben zeigte sich in den untersuchten Genorten kein Unterschied innerhalb der jeweiligen Spezies und im Vergleich zu anderen uns vorliegenden Proben aus Deutschland. Die Alignments der phylogenetischen Analysen aus den Sequenzen des MLST sind in Abbildung 10 bis 14 zu sehen.

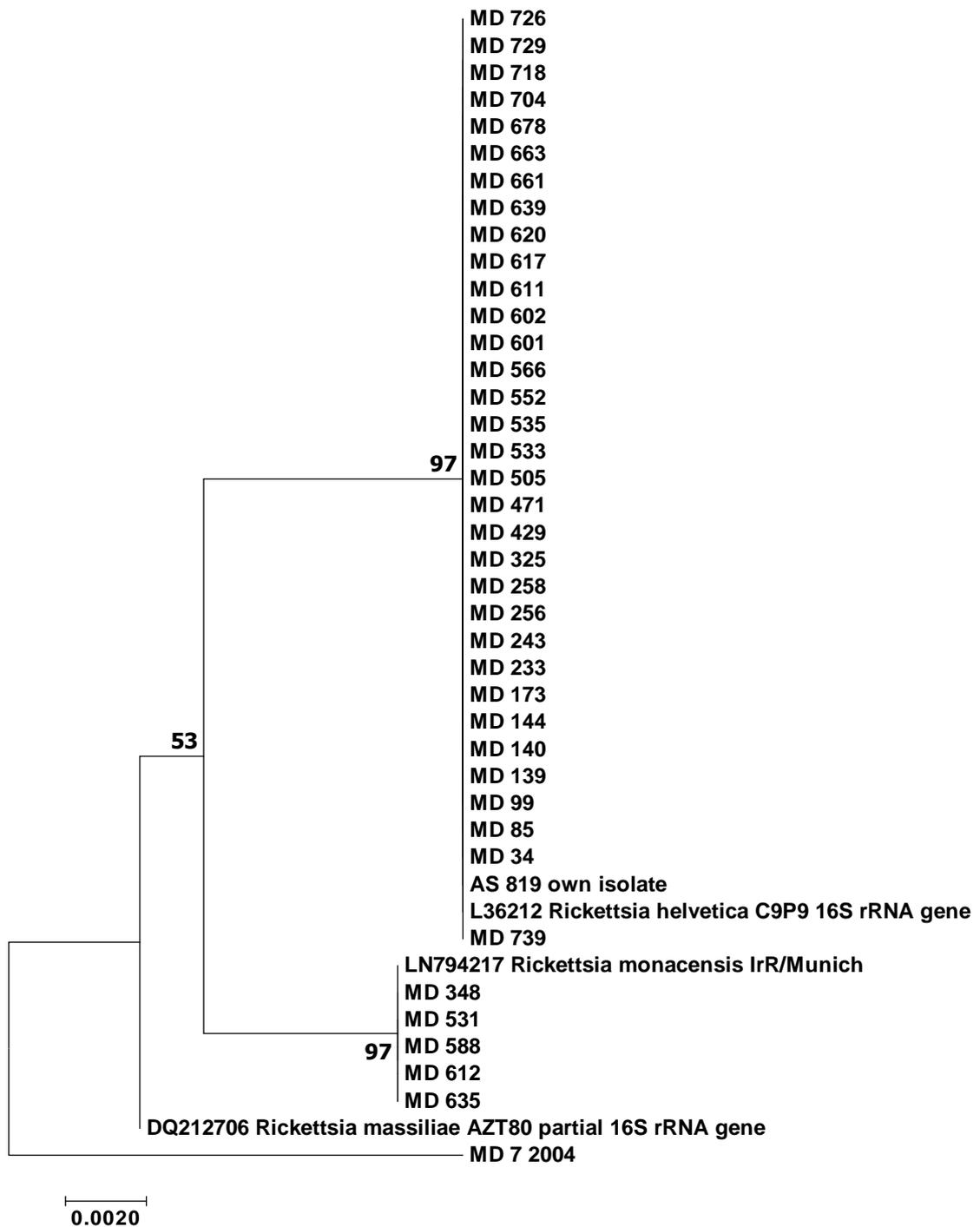


Abbildung 10 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen 16S rDNA Gens

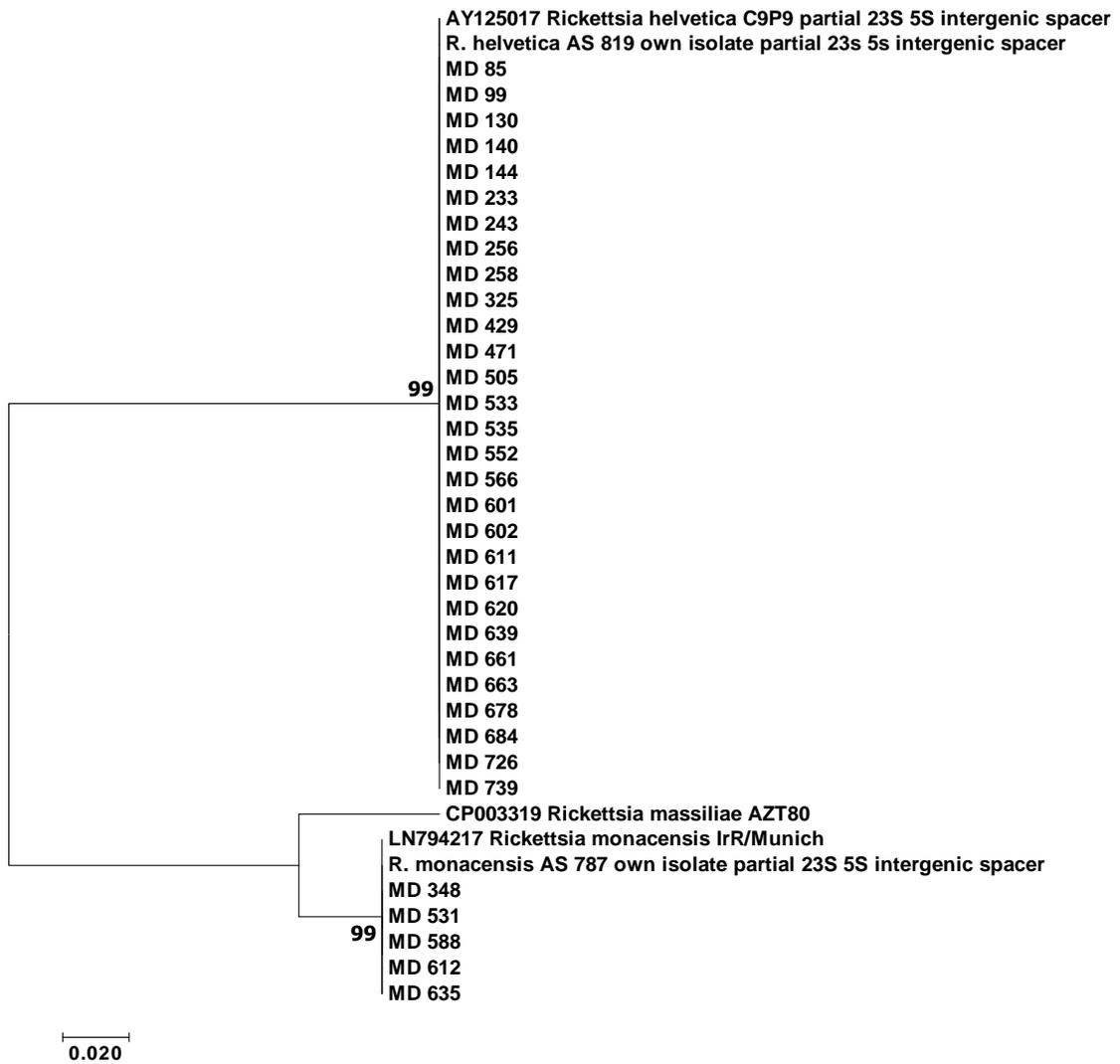


Abbildung 11 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse der 5S-23S intergenic spacer region

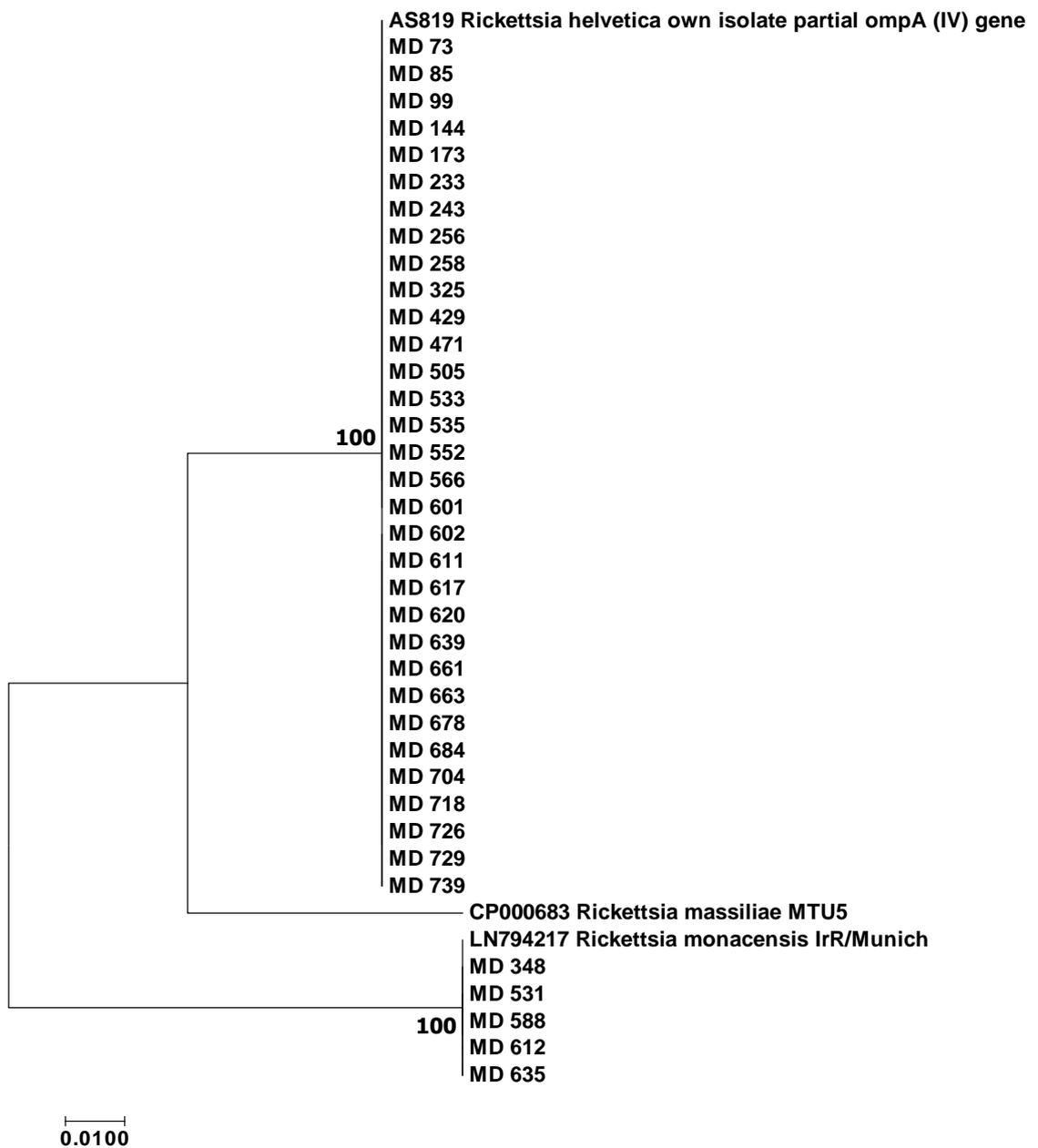


Abbildung 12 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompA (Fragment IV) Gens

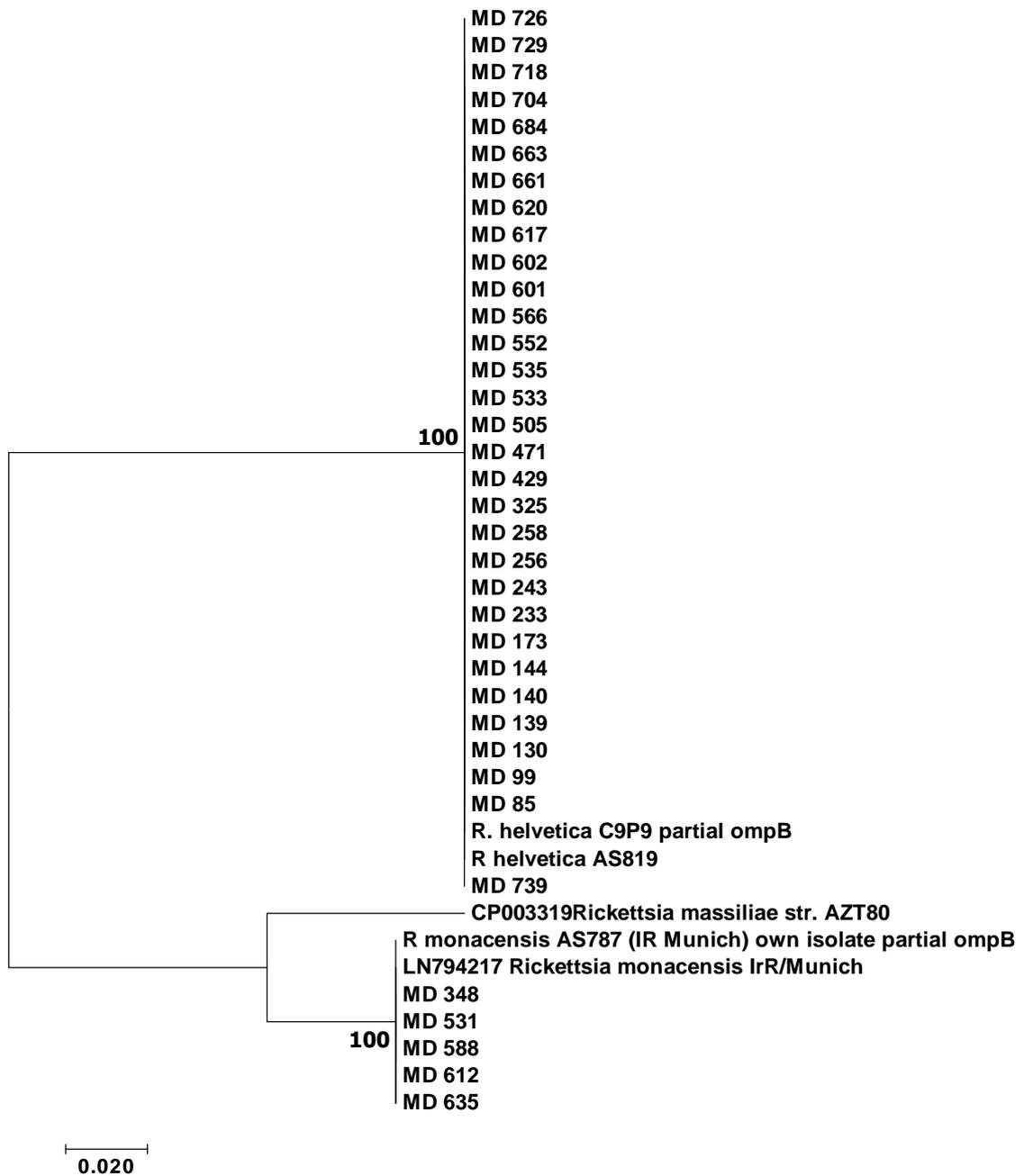


Abbildung 13 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompB Gens

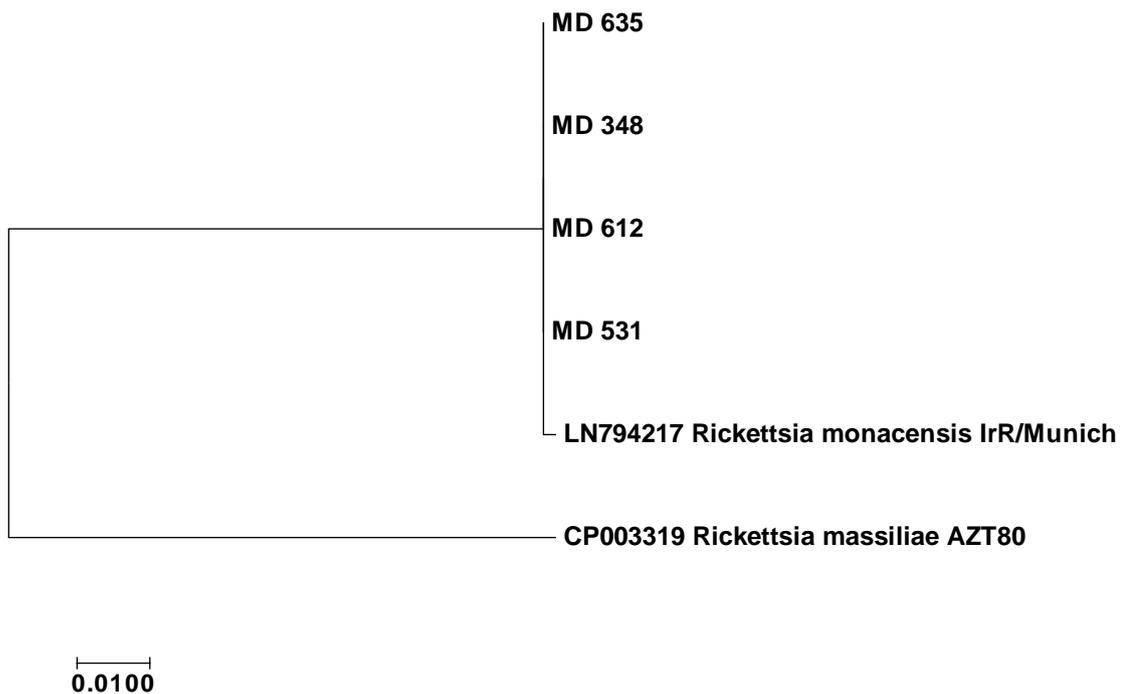


Abbildung 14 Phylogenetischer Stammbaum der verfügbaren Sequenzen von *Rickettsia monacensis* (aus Mühldorf) des partiellen ompA (Fragment I) Gens von *Rickettsia monacensis*

3.2 Erregeranzucht

Aus 59 Rickettsien-positiven Proben wurde bei 41 Proben ein kultureller Anzuchtversuch unternommen. Dieser war bei 35 Proben erfolgreich. Dabei war die Shell-Vial-Technik gegenüber konventioneller Zellkultur deutlich überlegen, die Ergebnisse im Vergleich sind in Tabelle 20 dargestellt. In den SV konnten 32 *R. helvetica* Stämme und 3 *R. monacensis* Stämme erfolgreich kultiviert werden, während mittels konventioneller Technik lediglich die Isolation von 20 Stämmen *R. helvetica* und keine erfolgreiche Anzucht von *R. monacensis* gelang. Gesamt war sowohl das Δ CT (CT-Wert am Tag der Ernte (dx) - CT-Wert am Tag der Anzucht (d0)) im Durchschnitt als auch die Anzahl der erfolgreich isolierten Stämme in Shell-Vial-Technik höher.

Insgesamt zeigte sich, dass eine erfolgreiche Anzucht der Erreger erst ab einem $CT < 35$ in der Pan-*Rickettsia*-PCR zu erwarten war. Die 18 nicht differenzierbaren Proben lagen alle deutlich darüber. Nach erneuter manueller Extraktion von DNA aus der doppelten Menge Homogenat wurden die Proben wiederholt mittels Pan-*Rickettsia*-PCR untersucht. Hier zeigte sich reproduzierbar bei allen Proben ein schwach positives Ergebnis. Diese Proben/Probenpools wurden somit als bestätigt positiv gewertet, jedoch reichte die Erregerlast in diesen Proben/Probenpools nicht für eine erfolgreiche Anzucht aus.

In Kultur gebrachte Proben/Probenpools (n=38)	Zellkultur (erfolgreich: rot erfolglos: beige)		T25- Δ CT	SV Δ CT
	T25	SV		
MD-73	neg	neg	0,00	0,00
MD-85	pos	pos	-6,88	-14,87
MD-99	pos	pos	-7,13	-10,87
MD-130	neg	neg	0,00	0,44
MD-139	neg	pos	0,86	-0,78
MD-140	neg	neg	-0,42	0,00
MD-144	neg	pos	1,43	-2,58
MD-233	neg	pos	1,43	-8,13
MD-243	pos	pos	-6,84	-6,42
MD-348	pos	pos	-9,00	-1,44
MD-429	pos	pos	-5,56	-12,98
MD-471	pos	pos	-6,04	-12,44
MD-505	pos	pos	-6,84	-9,80
MD-531	pos	pos	-3,63	-0,52
MD-533	pos	pos	-5,05	-15,63
MD-535	pos	pos	-7,19	-9,89
MD-541	neg	neg	0,00	0,00
MD-552	neg	pos	1,83	-10,31

MD-566	neg	pos	0,00	-1,92
MD-588	pos	pos	-4,34	-0,60
MD-601	neg	pos	0,00	-9,92
MD-602	neg	pos	0,00	-7,49
MD-611	pos	pos	-5,63	-12,90
MD-612	neg	pos*	0,00	-2,88
MD-617	pos	pos	-6,22	-9,35
MD-620	neg	pos	3,53	-14,85
MD-635	neg	pos*	0,00	-3,20
MD-639	pos	pos	-5,97	-10,14
MD-661	pos	pos	-6,26	-14,52
MD-663	pos	pos	-10,23	-8,60
MD-678	pos	pos	-1,88	-15,03
MD-684	pos	pos	-1,62	-5,40
MD-704	pos	pos	-1,04	-4,13
MD-718	neg	pos	2,10	-3,39
MD-724	neg	neg	0,00	0,00
MD-726	neg	neg	0,00	0,00
MD-729	neg	pos	2,07	-2,52
MD-739	pos	pos	-4,20	-9,71
Gesamt-Erfolgsrate (%) und Δ CT Gesamt	20/38 (52%)	32/38 (84%)	-2,60	-6,65

Δ CT erfolgreiche Kultur			-5,87	-14,88
---------------------------------	--	--	-------	--------

Tabelle 20 Zellkulturelle Verfahren im Vergleich SV versus T25; je negativer das Δ CT (Δ CT: CT Wert am Tag der Ernte (dx) - CT-Wert am Tag der Anzucht (d0)) ausfiel, desto stärker konnte der Erreger in Kultur vermehrt werden.

* Anzucht konnte in der Passage nicht erhalten werden

Bei unterschiedlichen Erfolgen der Inkubation der Anzuchten von *R. monacensis* bei 32°C erfolgte ein vergleichender Ansatz von fünf Stämmen bei drei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, 28°C, 32°C). Hier waren bei drei Stämmen die besten Ergebnisse bei 28°C zu erkennen, zwei Stämme konnten auch in diesem Ansatz nicht erfolgreich kultiviert werden.

	AS 787	MD 531	MD 588
RT Vero E6	(+)	(+)	(+)
28°C Vero E6	+++	+++	+++
32°C Vero E6	+	+	+

Tabelle 21 Erfolg Temperaturvergleich Anzucht *R. monacensis*

(+) fraglich erfolgreiche Anzucht: einzelne infizierte Zellen in IIFT

+ gering erfolgreiche Anzucht: wenige infizierte Zellen in IIFT

+++ erfolgreiche Anzucht: viele infizierte Zellen im IIFT

3.3 Indirekte Immunfluoreszenz Technik

Die Ergebnisse der durchgeführten Anzuchtkontrollen mittels IIFT bestätigten die in der PCR gewonnen positiven Ergebnisse (siehe Tabelle 22). Jedoch zeigte

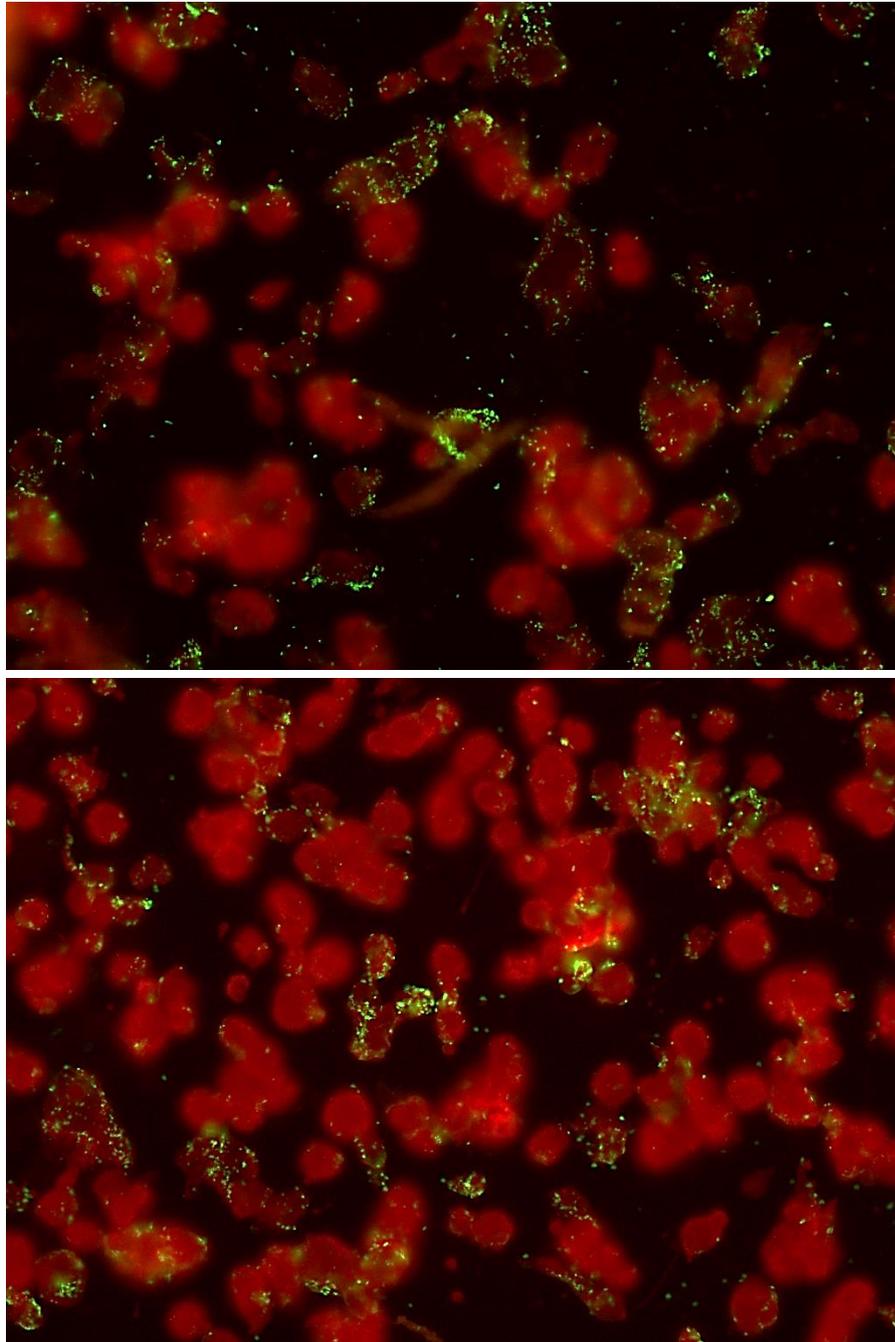
sich im mikroskopischen Bild nicht bei allen Proben die nach den PCR-Ergebnissen erwartete quantitativ höhere Anzahl an nachgewiesenen Rickettsien.

Nummer Probe	Ergebnis IIFT 1. Passage aus SV
MD-85	negativ
MD-99	positiv
MD-130	negativ
MD-139	positiv
MD-140	positiv
MD-144	positiv
MD-233	negativ
MD-531	positiv
MD-533	positiv
MD-541	negativ
MD-552	positiv
MD-566	positiv
MD-588	positiv
MD-612	negativ
MD-635	negativ
MD-684	positiv
MD-704	positiv
MD-718	positiv
MD-724	negativ
MD-726	positiv
MD-729	positiv
MD-739	positiv

Tabelle 22 Ergebnisse IIFT

Im Folgenden werden einige Beispiele für die Kontrolle der erfolgreichen Anzucht mittels IIFT gezeigt.

R. monacensis



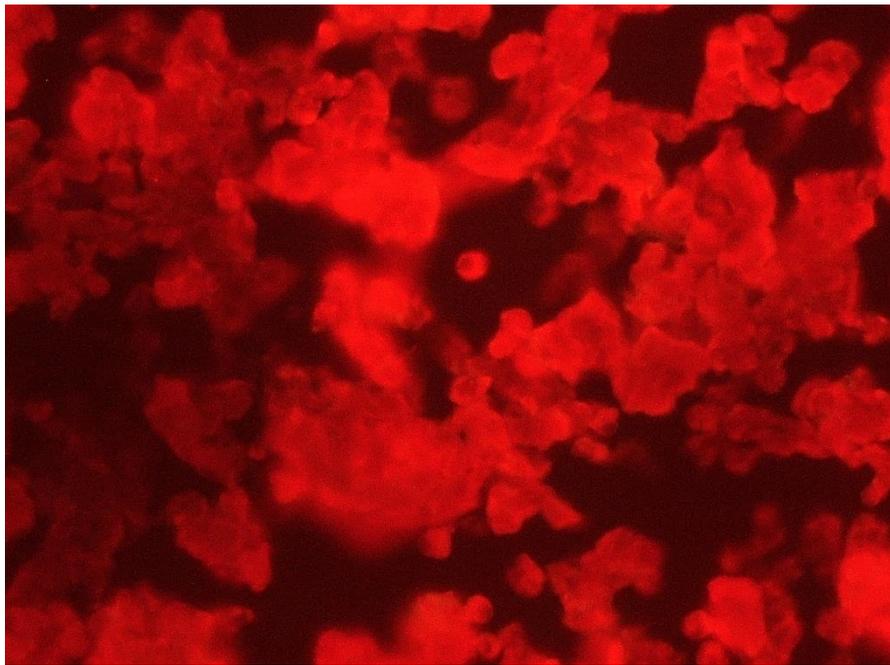
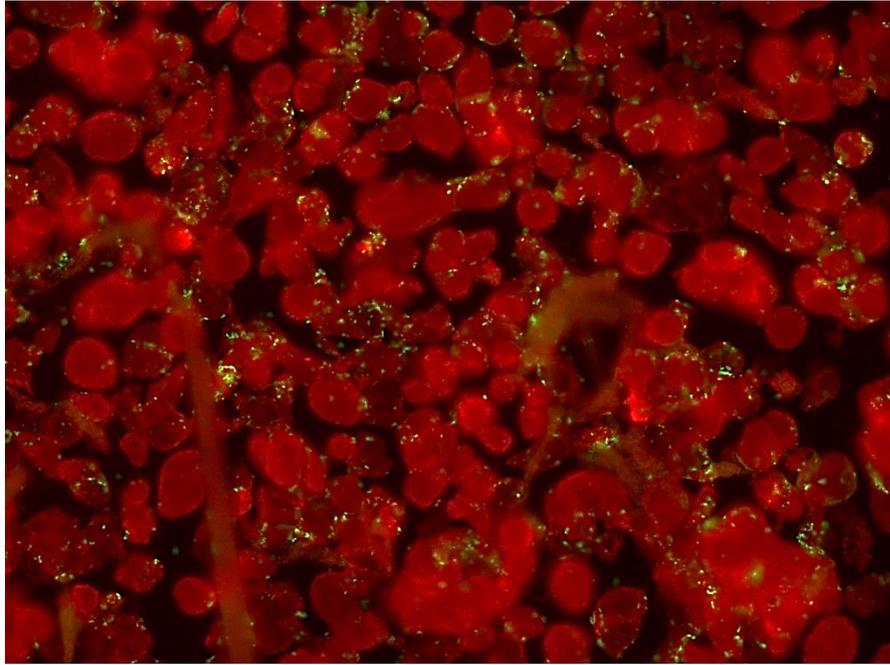
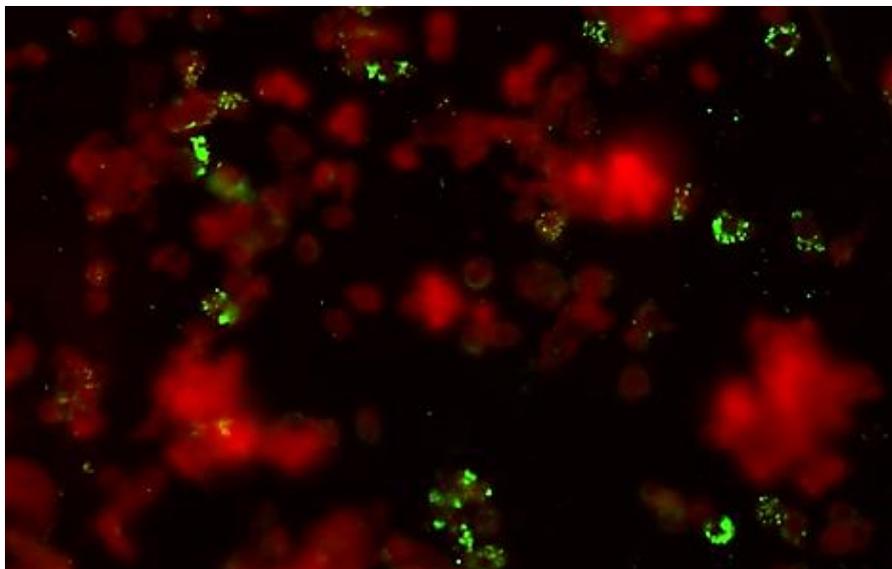
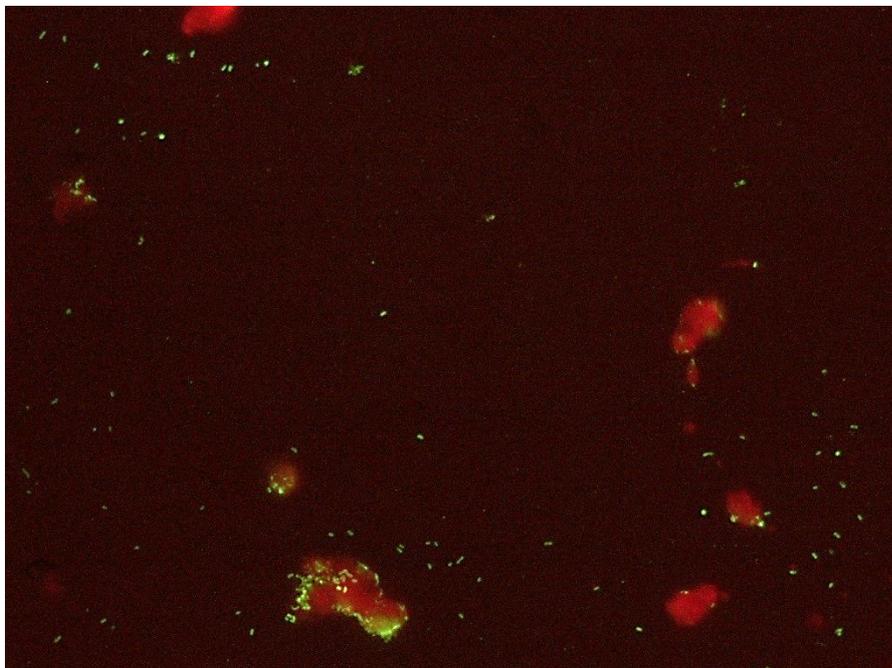
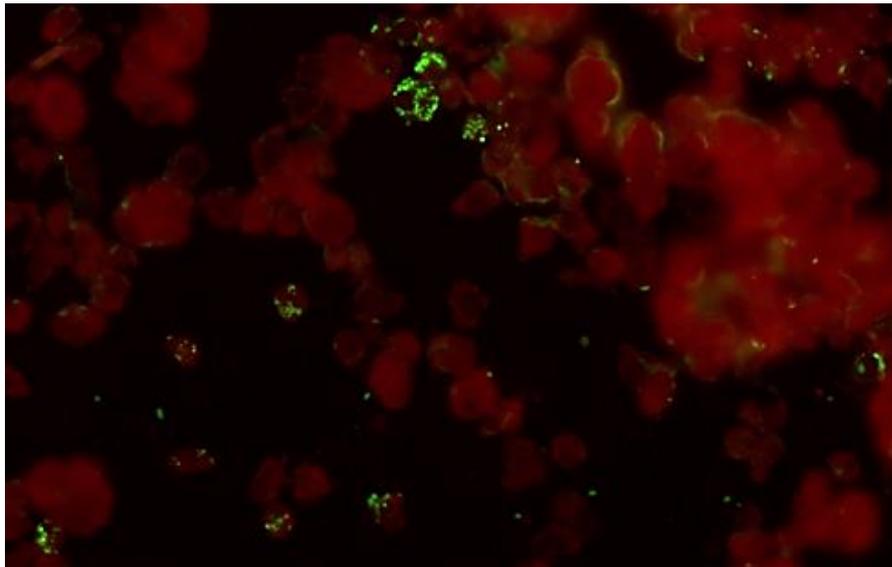


Abbildung 15 Anzuchtkontrolle mittels IIFT *R. monacensis*

(von oben nach unten: AS787 (eigener *Rickettsia monacensis* Stamm), MD 531, MD 588, Negativ-Kontrolle, jeweils 14 Tage nach Infektion bei 28°C Inkubationstemperatur)

Rot: Vero E6 Zellen Grün: *R. monacensis*

R. helvetica



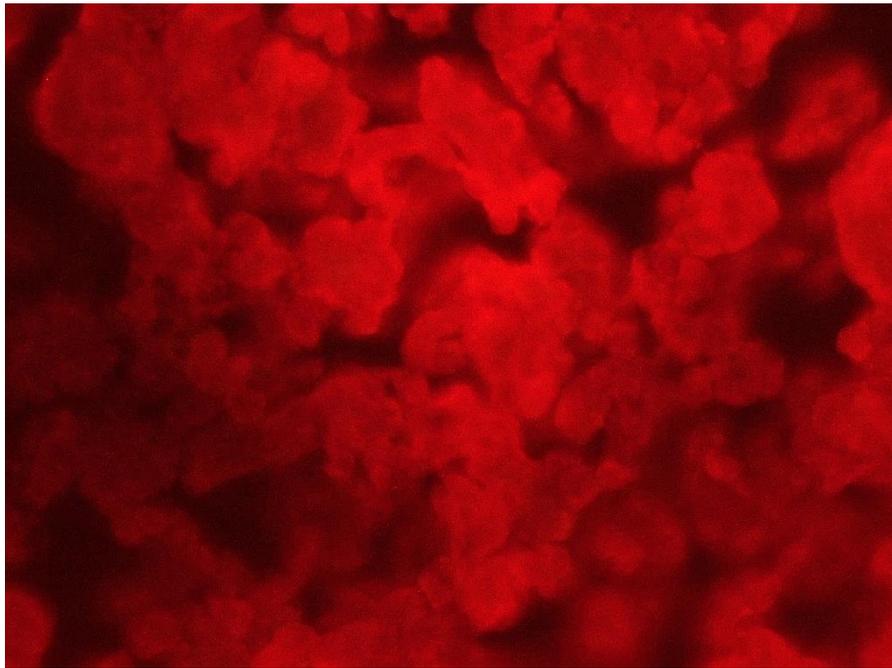


Abbildung 16 Anzuchtkontrolle mittels IIFT *R. helvetica*

(von oben nach unten: MD 726, MD 718, MD 139, Negativ-Kontrolle, jeweils 13 Tage nach Infektion bei 32°C Inkubationstemperatur)

Rot: Vero E6 Zellen Grün: *R. helvetica*

4 Diskussion

Rickettsien verursachen teils schwere Krankheitsbilder und kommen weltweit vor (Parola et al. 2013). Für Deutschland existieren bisher jedoch sehr begrenzt Daten zum Vorkommen von Rickettsien. Ziel dieser Arbeit war es, Daten zum Vorkommen von Rickettsien aus einer bisher nicht untersuchten Region in Südbayern zur Ergänzung der bisherigen Daten in Bezug auf Vorkommen von Rickettsien in Deutschland zu gewinnen und die Fähigkeiten zur Detektion und Erregerisolation zu verbessern. Rickettsienisolate für weitergehende molekularbiologische und phänotypische Untersuchungen fehlten bisher ganz. Ein weiteres Ziel war daher die Gewinnung von neuen Rickettsienisolaten aus Deutschland und aus dieser Region für weitere molekularbiologische Untersuchungen. Dabei wurde ebenfalls das Vorkommen, die Häufigkeit und die Diversität von Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe insgesamt in dieser Region untersucht und das Vorkommen einer einmalig im Jahr 2004 gefundenen Rickettsien-Spezies mit Ähnlichkeit zu *R. massiliae* überprüft.

4.1 Daten zum Vorkommen von Rickettsien

Im beprobten Gebiet wurde aus 1084 untersuchten *I. ricinus* in verschiedenen Entwicklungsstadien keine bisher unbekannt oder in Deutschland nicht zuvor als endemische gezeigte Rickettsien-Spezies entdeckt. Jedoch wurde das Vorkommen von *R. monacensis* und *R. helvetica* mit mehrfachem Nachweis der Infektion innerhalb der untersuchten *Ixodes*-Zecken bestätigt und somit die epidemiologischen Daten weiter ergänzt. Insgesamt wurde mit einer MIR von 5,4% gesamt sowie 3,32% für *R. helvetica* und 0,46% für *R. monacensis* eine, im Vergleich zu zuvor beprobten Gebieten in Deutschland, durchschnittliche Durchseuchung der *Ixodes*-Zecken mit Rickettsien festgestellt (Silaghi 2008; Dobler und Wölfel 2009; Dobler et al. 2009; Schorn et al. 2011; Franke et al. 2010). Daher ergibt sich auch nicht die Annahme, dass das beprobte Gebiet ein besonders günstiges, ungünstiges oder anderweitig außergewöhnliches Habitat für Zecken und Rickettsien darstellt.

Es gibt Hinweise auf ein möglicherweise fokales Vorkommen von *R. monacensis*, da diese Art nur in zwei der fünf Sammelorte nachgewiesen werden konnte, die örtlich direkt nebeneinander liegen. Gründe dafür sind aus den für diese Untersuchung vorliegenden Daten nicht zu erkennen. Möglicherweise spielt hier eine Rolle, welcher Wirt für die Zecken zur Verfügung steht und ein natürliches Reservoir für Rickettsien darstellt. 2005 wurde in einer Studie in Italien eine hohe Prävalenz von *R. monacensis* in von Eidechsen abgesammelten *Ixodes*-Zecken nachgewiesen (Kubelová et al. 2015). Diese Reptilien könnten ein Reservoir für

Rickettsien, insbesondere *R. monacensis*, darstellen. Sie sind wechselwarme Organismen und bevorzugen mildere Klimazonen, was erklären würde, dass diese Rickettsien-Art häufiger in Südeuropa nachgewiesen wurde.

Sollte sich dieses Muster in weiteren Untersuchungen an anderen Orten wiederholen, könnten möglicherweise auch weitere Umweltfaktoren identifiziert werden, die die Etablierung von *R. monacensis* in bestimmten Regionen begünstigen. Der Interessensschwerpunkt in der vorliegenden Arbeit war jedoch nicht auf die im Sammelgebiet vorliegenden Umweltfaktoren wie Temperatur, Wetterbedingungen, Wildtieraufkommen und Ähnliches gerichtet. Des Weiteren wurden auch alle Zecken innerhalb eines Jahres im Zeitraum von April bis Oktober gesammelt. Will man also in Zukunft solche Faktoren identifizieren, müssen diese vorab definiert und gezielter untersucht werden. Auch wäre eine Betrachtung über einen längeren Zeitraum mit Stichproben zu verschiedenen Jahreszeiten und unter Berücksichtigung der sich verändernden Umweltfaktoren hinsichtlich klimatischer, baulicher und anderer Veränderungen über die Zeit sinnvoll. Diese Daten wurden in der vorliegenden Arbeit nicht systematisch erfasst, sodass ein Vergleich mit anderen Regionen hinsichtlich dieser Fragestellung an dieser Stelle nicht sinnvoll ist.

4.2 Verbesserung der Fähigkeiten zur Detektion

Für den Nachweis von Rickettsien stehen verschiedene molekularbiologische Techniken zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich PCR-Nachweise verwendet, ergänzt durch Indirekte Immunfluoreszenz. Der Nachweis von Rickettsien allgemein gelingt mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden zufriedenstellend, allerdings ist die Unterscheidung zwischen den Spezies aufwendig und zeitintensiv. In vorherigen Arbeiten wurden unterschiedliche Kriterien für die Definition einer neuen Spezies festgelegt. Die aktuelle Grundlage zur Unterscheidung bezieht sich auf Unterschiede in den Gensequenzen von *ompA*, *ompB*, *gltA* und 16S rDNA (Fournier et al. 2003).

Im in dieser Untersuchung durchgeführten MLST der Genorte *ompA*, *ompB*, 16S-rDNA zeigten sich innerhalb der untersuchten Proben und im Vergleich zu anderen vorliegenden Proben keine Unterschiede im Genom. Die bisher bekannten und hier untersuchten Genorte eignen sich daher vermutlich nicht, um Unterschiede in der Pathogenität der Rickettsien darzustellen und auch nur bedingt zur Differenzierung der unterschiedlichen Spezies.

Die ebenfalls untersuchte 23S-5S intergenic spacer region wurde in dieser Studie und in weiteren (Kakumanu et al. 2016; Chitimia-Dobler et al. 2017) als hypervariable Region zur möglicherweise besseren Differenzierung zwischen den Spezies und gegebenenfalls auch für Unterschiede innerhalb einer Spezies identifiziert. In der vorliegenden Untersuchung war hier als einziges auch eine Deletion nachzuweisen, nämlich innerhalb der verglichenen *R. helvetica* Sequenzen. Hier

war ein deutlicher Unterschied (110 zu 65 Basenpaare) der Stämme 50-5 Koblenz und 52-1 Altenkirchen zu den Zecken aus dieser Untersuchung nachzuweisen. Deletionen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle für die Pathogenität von Rickettsien. In mehreren Studien wurde ein möglicher Zusammenhang für unterschiedliche Pathogenität mit Deletionen und/oder Insertionen bei unterschiedlichen Stämmen einer Rickettsien-Art, oder auch zwischen verschiedenen Arten, gezeigt (Ellison et al. 2008; Felsheim et al. 2009). *R. rickettsii* und *R. prowazekii*, welche die Erreger für die gefährlichsten Rickettsiosen sind, besitzen zudem die kürzesten Genome (Fournier et al. 2009).

R. helvetica wurde lange als nicht humanpathogen betrachtet, da trotz des flächendeckenden Vorkommens in Deutschland und Europa keine symptomatischen Infektionen beim Menschen nachgewiesen wurden. 2010 wurde jedoch ein Fall beschrieben, in dem *R. helvetica* im Liquor einer Patientin mit akuter Meningoenzephalitis nachgewiesen wurde (Nilsson et al. 2010). In weiteren Fällen ist ein Zusammenhang von Infektionen mit *R. helvetica* und Perimyokarditis bei Patienten aus Frankreich beschrieben worden (Fournier et al. 2000). Es gibt aber bisher keine Erklärung für die unterschiedliche Pathogenität von *R. helvetica*. Patientenbezogene Risikofaktoren können auf die Schwere der Erkrankung Einfluss nehmen. Genetische Unterschiede innerhalb einer Spezies könnten hier jedoch auch eine Rolle spielen. Bisher gibt es aber keine vergleichenden Untersuchungen der Genome verschiedener Stämme von *R. helvetica*. Lediglich ein Vergleich des Stammes C9P9 mit *R. massiliae* und *R. prowazekii* wurde bisher durchgeführt und zeigte deutliche Unterschiede (Dong et al. 2012). Isolate und vollständige Genome von *R. helvetica* Stämmen aus den klinischen Fällen liegen bisher nicht vor. Damit konnten auch die in dieser Arbeit gewonnenen Gen-Sequenzen nicht verglichen werden, um mögliche Unterschiede zu erfassen und weiter zu untersuchen. Zukünftig ist es daher von großer Bedeutung, den molekularbiologischen Nachweis und möglichst eine kulturelle Anzucht von *R. helvetica* in Verbindung mit klinisch manifesten Rickettsiosen zu erreichen, um die Frage der unterschiedlichen Pathogenität zu klären. Je mehr Isolate mit Unterschieden in einem oder mehreren Genorten zum Vergleich vorliegen, desto besser können diese Variationen hinsichtlich der Pathogenität untersucht werden. Der Beitrag dieser Arbeit zu diesem zukünftigen Forschungsziel ist der Nachweis und die Gewinnung von zahlreichen Sequenzen von *R. helvetica* und *R. monacensis* im MLST sowie der erfolgreichen kulturellen Anzucht und somit der Gewinnung von Material für weitergehende Untersuchungen.

Für die *R. helvetica* spezifische Real-Time-PCR wurde bezüglich der vorliegenden Proben eine gute Sensitivität und Spezifität gezeigt. Alle hier positiven Proben wurden im MLST ebenfalls als *R. helvetica* identifiziert. Die diagnostischen Möglichkeiten zur schnellen Identifikation einer Spezies im Falle einer Infektion sind sehr begrenzt. Bisher waren die üblichen Nachweisverfahren zum Direktnachweis von Rickettsien in erster Linie konventionelle molekularbiologische Ver-

fahren und nachfolgende Identifizierung durch Immunfluoreszenz und Sequenzierung, alternativ oder auch ergänzend zellkulturelle Verfahren. Als nachteilig bei diesen Verfahren ist der relativ hohe Aufwand und die Verfügbarkeit der Methoden an wenigen spezialisierten Zentren sowie im Zusammenhang mit der Zellkultur der hohe zeitliche Aufwand der Untersuchung anzusehen. Einfach zu gewinnendes Probenmaterial wie Blutproben sind für die Diagnostik meist nicht gut geeignet, da rickettsiale Nukleinsäure – wenn überhaupt – nur in geringer Konzentration während einer Bakteriämie vorliegt. Eine Identifizierung durch eine hochempfindliche, spezifische Real-Time-PCR-Methode könnte eine wertvolle Zeitersparnis bei der Diagnostik und somit eine schnellere Therapieentscheidung bringen. Zusätzlich wäre eine Einschätzung zum erwarteten Krankheitsverlauf in Zusammenschau mit patientenindividuellen Risikofaktoren möglich. Die *Rickettsia helvetica* spezifische Real-Time-PCR basiert auf der 5S-23S intergenetischen Spacer-Region, deren relativ konservative Flanken eine hypervariable Sequenz umschließen. Diese Zielregion kann auch Möglichkeiten für die Entwicklung weiterer spezifischer Real-Time-PCR-Nachweisverfahren bieten. Auch in der Forschung können solche Verfahren zeit- und kostensparend eingesetzt werden. In Kombination mit einer weitreichenden Kenntnis der endemischen Rickettsien-Arten in Bezug auf ein Gebiet, in dem ein Patient eine Infektion erworben hat, könnte eine schnelle und spezifische Diagnostik erfolgen.

4.3 Verbesserung der Fähigkeiten zur Erregerisolation und kulturelle Gewinnung von neuen Rickettsienisolaten

Das beschriebene Protokoll zur Erregeranzucht in Zellkultur erbrachte eine gute Rate an erfolgreichen Isolationen. Insbesondere die erfolgreichere Anzucht mittels Shell-Vial-Technik im Vergleich zur konventionellen Zellkultur zeigt, dass diese bei zukünftigen Untersuchungen zu bevorzugen ist. Auch in vorangegangenen Untersuchungen gibt es für unterschiedliche Rickettsien Hinweise, dass die Anzucht mittels SV erfolgreicher verläuft (Kelly et al. 1991; Birg et al. 1999). Hier wurde dies durch die gewonnenen Isolate von *R. monacensis* und die höhere Anzahl an Isolaten von *R. helvetica* für diese beiden Rickettsien-Spezies bestätigt.

Grundlage dafür könnte eine erleichterte Zellinvasion der Rickettsien durch die mechanischen Kräfte oder eine höhere Dichte der zelladhärenten Erreger durch die Zentrifugation im Gegensatz zur passiven „Ablagerung“ der Rickettsien auf den Zellen bei konventioneller Zellkultur sein, da sich Rickettsien nicht aktiv fortbewegen können. Bei den Mechanismen der Zellinvasion gibt es zusätzlich Unterschiede zwischen den Gruppen. Ob die unterschiedlichen Invasionsmechanismen unmittelbaren Einfluss auf die Pathogenität der unterschiedlichen Arten haben, konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist jedoch möglich, dass die unterschiedlichen Invasionsmechanismen in Bezug auf den kulturellen Nachweis eine Erklärung für den höheren Erfolg von Anzuchten in Shell-Vial-Technik für beide

Gruppen darstellen. Die diskutierte höhere Anzahl von zelladhärenten Rickettsien erleichtert in beiden Fällen die Invasion der Erreger in die Zelle. Durch die Zentrifugation erfolgt die „Ablagerung“ auch innerhalb kürzerer Zeit als beim passiven, rein durch die Schwerkraft bedingten Absetzen der Erreger. Hierdurch kann die Vermehrung in der Kultur schneller beginnen und insgesamt bis zur Passage eine höhere Infektionsrate, beziehungsweise eine höhere Erregerzahl innerhalb der Kultur erreicht werden.

Aus den SV erfolgte nach 6 - 8 Tagen eine Passage in konventionelle Zellkulturflaschen, um einem toxischen Effekt der Infektion bezogen auf die geringere Zellzahl vorzubeugen. Durch die vermutete höhere Infektionsrate der Zellen in den SV im Vergleich zur konventionellen Anzucht kann erklärt werden, dass trotzdem in den Passagen der höhere Anzuchterfolg erhalten blieb.

R. helvetica wurde in Vero E6 Zellen bei einer Temperatur von 32°C erfolgreich angezüchtet. Es ist also davon auszugehen, dass dies die optimale Temperatur für die Vermehrung des Erregers in dieser Zelllinie ist. Im Vergleich dazu waren jedoch *R. monacensis* Anzuchten bei 32°C nicht oder weniger erfolgreich. Parallele Anzuchten bei unterschiedlichen Temperaturen erbrachten optimale Ergebnisse bei 28°C. Hinsichtlich des kulturellen Erregernachweises aus Patientenproben müssen diese Unterschiede berücksichtigt und weiter untersucht werden. Ein Anzuchterfolg aus Patientenmaterial, insbesondere aus Blut ist bisher nur selten gelungen (Marrero und Raoult 1989). Aus Biopsien von Haut im Bereich der Eschare bei Rickettsien-Spezies, die diese typischerweise ausbilden, ist ein Nachweis häufiger gelungen (Melles et al. 1999). Ein weiterer Ansatzpunkt zur Optimierung der Anzucht von *R. monacensis* wäre die Verwendung anderer Zelllinien wie zum Beispiel Insektenzellen, welche bei geringeren Temperaturen inkubiert werden können, da sie von wechselwarmen Organismen stammen. Eine Anzucht von *R. monacensis* in einer Zelllinie, welche von Zecken stammt, gelang in vorherigen Untersuchungen; hierbei wurden jedoch die Zellen bei 34°C inkubiert (Simser et al. 2002). Vergleichende Ansätze mit verschiedenen Zelllinien und bei unterschiedlichen Temperaturen könnten in zukünftigen Untersuchungen ein genaueres Ergebnis liefern, welche Zellen und welche Temperatur zu einem optimalen Anzuchtergebnis für *R. monacensis* führen.

Da bei größeren Wirbeltieren selten generalisierte Rickettsiämien auftreten, könnte eine Abhängigkeit der Vermehrungsrate von der Umgebungstemperatur eine Rolle für den Nachweis als auch für die Erregeranzucht aus Patientenmaterial spielen. Der höhere Erfolg von Nachweisen aus Hautproben kann bei Arten mit geringerem Temperaturoptimum zur Vermehrung mit einer höheren Erregerdichte an diesen Körperstellen führen. Menschliche Haut hat je nach Umgebungstemperatur eine Temperatur von 24 - 34°C. Wenn sich die Rickettsien nach einem Stich dort etablieren und vermehren können, kann eine Infektion von dort ausgehend generalisiert auftreten. Möglicherweise entscheidend in der Frage der unterschiedlichen Pathogenität von Rickettsien ist, wie die Erreger die höhere Temperatur im Blut, im Körperkern und in den befallenen Organen kompensieren

und sich dort weiter vermehren. Der dann auftretende pathogene Effekt ist nicht durch den Erreger selbst, sondern durch die Immunreaktion bedingt und z.B. Zytokin-induziert. Hierdurch entsteht eine Fehlfunktion der befallenen Epithelien und in der Folge ein Organversagen (Sahni et al. 2019). In der Fallbeschreibung einer Patientin mit Meningoenzephalitis erfolgte ein Nachweis von *R. helvetica* aus dem Liquor der Patientin (Nilsson et al. 2010). Die Rickettsien wurden hier vermutlich aus befallenem Gewebe in die umgebende Körperflüssigkeit freigesetzt. Es gilt hier weitere Forschung anzustreben, um die genauen Zusammenhänge zu den Pathomechanismen zu klären.

Hinsichtlich der klimatischen Bedingungen für eine Vermehrung der Erreger im natürlichen Reservoir, könnte auch eine Erklärung für das bevorzugte Vorkommen verschiedener Arten in bestimmten klimazonengebundenen Vektoren liegen. Die Vektoren und Wirte sind biologisch an wärmere oder kältere Bedingungen angepasst, die Erreger vermehren sich symbiontisch am besten innerhalb der entsprechenden Reservoirs. Eine Änderung dieser Bedingungen kann zu höheren oder geringeren Nachweisquoten bzw. Erregerzahlen führen und stellt somit einen möglichen Einflussfaktor für das Risiko der Krankheitsübertragung dar.

4.4 Klärung des Vorkommens einer einmalig im Jahr 2004 gefundenen Rickettsien-Spezies mit Ähnlichkeit zu *R. massiliae*

Die 2004 in der 16S *R. massiliae* ähnliche Spezies wurde im beprobten Gebiet nicht erneut nachgewiesen. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine zu kleine Stichprobe bezüglich dieser Fragestellung in vorliegender Arbeit. Eine weitere, ausgedehntere Beprobung des Gebiets wäre möglich, um dieser Frage weiter auf den Grund zu gehen. Allerdings muss auch in Betracht gezogen werden, dass der Nachweis ein zum damaligen Zeitpunkt einmaliger Befund war und sich die Spezies nicht dauerhaft in dem dort vorhandenen Reservoir etablieren konnte. Es gibt Hinweise, dass bestimmte Spezies und Subspezies in definierten Klimazonen ausschließlich oder gehäuft vorkommen (Parola et al. 2013). Viele Rickettsien befallen zudem bevorzugt eine bestimmte Zecken-Spezies. Für *R. massiliae* ist dies *Rhipicephalus sanguineus*. Diese Art Zecken kommt bisher vor allem in Regionen mit wärmerem Klima vor. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise, dass sich in den letzten Jahren verschiedene Zecken-Arten weiter Richtung Norden ausbreiten, wo sie bisher nicht oder kaum vorkamen (Dautel et al. 2006).

Eine mögliche Erklärung für den einmaligen Nachweis wäre ein Einschleppen der beschriebenen Spezies in das beprobte Gebiet, in einem Zeitraum, in dem Bedingungen herrschten, die für *R. sanguineus* günstig waren. Das beprobte Waldgebiet dient des Weiteren als Naherholungsgebiet für Spaziergänger und deren Haustiere. Eine Einschleppung von Zecken zum Beispiel aus Urlaubsgebieten mit Vorkommen von *R. massiliae*, oder anderer nicht vor Ort endemischer Spe-

zies und die Übertragung der Erreger auf die lokale Zeckenpopulation in einzelnen Fällen wäre daher denkbar und könnte den einmaligen Nachweis erklären. Wenn bis zur nächsten Beprobung die Übertragung der Erreger an weitere Wirtstiere oder andere Zecken nicht erfolgt ist, konnte sich der Erreger nicht dauerhaft vor Ort etablieren. Die dauerhafte Etablierung eines Erregers ist von mehreren Faktoren abhängig. Vektoren, Wirte und deren Biologie, sowie die des Erregers selbst, spielen hierbei eine wesentliche Rolle.

Für die Übertragung von Rickettsien von Zecke zu Zecke sind verschiedene Wege untersucht und beschrieben worden. Sie kann innerhalb einer Zeckenpopulation sowohl vertikal als auch horizontal erfolgen. In einem künstlichen Fütterungsmodell wurde eine horizontale Übertragung von *R. massiliae* und *R. raoultii* bei Co-Feeding für *D. reticulatus* und *R. sanguineus* nachgewiesen (Olivieri et al. 2018). Bei einer ausreichenden Bakteriämie eines Wirts ist diese Übertragung auch auf *Ixodes*-Zecken denkbar. Für diese Art Zecken ist wiederum eine transovarielle Übertragung verschiedener Rickettsien-Arten beschrieben. Ein Vorkommen von *R. massiliae* in dem beprobten Gebiet unter guten Bedingungen für die verschiedenen Vektoren in verschiedenen Entwicklungsstadien zu einem definierten Zeitpunkt vor dem ersten Nachweis könnte bestanden haben. Eine Änderung der Umweltbedingungen könnte jedoch dazu geführt haben, dass sich der Erreger vor Ort nicht weiter vermehren und dauerhaft etablieren konnte und so zum Zeitpunkt dieser Studie nicht mehr nachgewiesen werden konnte. In diesem Fall würde auch eine größere Stichprobe keinen weiteren Nachweis und damit keine neuen Erkenntnisse liefern.

Insgesamt gibt es wenige Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen klimatischen Bedingungen und dem Vorkommen bestimmter Rickettsien-Spezies. Will man diesen Zusammenhang eindeutig klären, wären weitere umfangreiche Untersuchungen in vielen Gebieten mit unterschiedlichen klimatischen Bedingungen über längere Zeiträume mit regelmäßiger Beprobung und Untersuchung notwendig. Es zeigen sich jedoch aktuell angesichts des Klimawandels immer mehr lokale und globale Extremwetterlagen. Auch Temperaturen und Niederschlagsmengen im Jahresverlauf verändern sich stetig (Wetter und Klima - Deutscher Wetterdienst - Basisfakten zum Klimawandel 2022). Diese wechselhaften Bedingungen erschweren es zusätzlich, einen eindeutigen Zusammenhang herzustellen.

Das entsprechende Originalmaterial zum Nachweis der *R. massiliae* ähnlichen Rickettsien-Spezies ist nicht mehr vorhanden, es existieren nur die 16S rDNA-Sequenzdaten. Daher ist auch eine weitere Untersuchung weiterer MLST-Targets der fraglichen Probe und der Vergleich mit den neu gewonnenen Stämmen, eine Erregeranzucht oder weitere Untersuchungen zur Klärung dieses Befundes nicht mehr möglich. Es bleibt also ungeklärt, welche Spezies zu diesem Befund geführt hat und ob in diesem Gebiet eine Ausbreitung bisher als nicht endemisch betrachteter Rickettsien-Arten im Zusammenhang mit Klimaveränderungen und

veränderter Ausbreitung verschiedener Vektoren stattgefunden hat oder weiterhin stattfindet.

Literaturverzeichnis

- Beati, L.; Meskini, M.; Thiers, B.; Raoult, D. (1997): *Rickettsia aeschlimannii* sp. nov., a new spotted fever group rickettsia associated with *Hyalomma marginatum* ticks. In: *International journal of systematic bacteriology* 47 (2), S. 548–554. DOI: 10.1099/00207713-47-2-548.
- Birg, M. L.; La Scola, B.; Roux, V.; Brouqui, P.; Raoult, D. (1999): Isolation of *Rickettsia prowazekii* from blood by shell vial cell culture. In: *Journal of Clinical Microbiology* 37 (11), S. 3722–3724. DOI: 10.1128/JCM.37.11.3722-3724.1999.
- Blazejak, K.; Janecek, E.; Strube, C. (2017): A 10-year surveillance of Rickettsiales (*Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum*) in the city of Hanover, Germany, reveals *Rickettsia* spp. as emerging pathogens in ticks. In: *Parasites & vectors* 10 (1), S. 588. DOI: 10.1186/s13071-017-2537-2.
- Brouqui, P.; Bacellar, F.; Baranton, G.; Birtles, R. J.; Bjoërsdorff, A.; Blanco, J. R. et al. (2004): Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10 (12), S. 1108–1132. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2004.01019.x.
- Brouqui, P.; Parola, P.; Fournier, P.-E.; Raoult, D. (2007): Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 49 (1), S. 2–12. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2006.00138.x.
- Chitimia-Dobler, L.; Dobler, G.; Schaper, S.; Küpper, T.; Kattner, S.; Wölfel, S. (2017): First detection of *Rickettsia conorii* ssp. *caspia* in *Rhipicephalus sanguineus* in Zambia. In: *Parasitol Res* 116 (11), S. 3249–3251. DOI: 10.1007/s00436-017-5639-z.
- Chitimia-Dobler, L.; Rieß, R.; Kahl, O.; Wölfel, S.; Dobler, G.; Nava, S.; Estrada-Peña, A. (2018): *Ixodes inopinatus* - Occurring also outside the Mediterranean region. In: *Ticks and tick-borne diseases* 9 (2), S. 196–200. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.09.004.
- Chitimia-Dobler, L.; Schaper, S.; Rieß, R.; Bitterwolf, K.; Frangoulidis, D.; Bestehorn, M. et al. (2019): Imported *Hyalomma* ticks in Germany in 2018. In: *Parasites & vectors* 12 (1), S. 134. DOI: 10.1186/s13071-019-3380-4.
- Cox, A. L.; Tadi, Prasanna (2022): StatPearls. Weil Felix Test. Treasure Island (FL).
- Cox, H. R. (1938): Use of Yolk Sac of Developing Chick Embryo as Medium for Growing Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever and Typhus Groups. In: *Public Health Reports (1896-1970)* 53 (51), S. 2241. DOI: 10.2307/4582741.
- Dautel, H.; Dippel, C.; Oehme, R.; Hartelt, K.; Schettler, E. (2006): Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. In: *International Journal of Medical Microbiology* 296 Suppl 40, S. 149–156. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.01.013.
- Djerbouh, A.; Kernif, T.; Beneldjouzi, A.; Socolovschi, C.; Kechemir, N.; Parola, P. et al. (2012): first molecular detection of *Rickettsia aeschlimannii* in the ticks of camels from southern Algeria. In: *Ticks and tick-borne diseases* 3 (5-6), S. 374–376. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.014.

- Dobec, M.; Golubic, D.; Punda-Polic, V.; Kaeppli, F.; Sievers, M. (2009): *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. In: *Emerging infectious diseases* 15 (1), S. 98–100. DOI: 10.3201/eid1501.080815.
- Dobler, G.; Essbauer, S.; Wölfel, R. (2009): Isolation and preliminary characterisation of '*Rickettsia monacensis*' in south-eastern Germany. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 2, S. 263–264. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.02227.x.
- Dobler, G.; Wölfel, R. (2009): Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. In: *Deutsches Arzteblatt international* 106 (20), S. 348–354. DOI: 10.3238/arztebl.2009.0348.
- Dong, X.; El Karkouri, K.; Robert, C.; Gavory, F.; Raoult, D.; Fournier, P.-E. (2012): Genomic comparison of *Rickettsia helvetica* and other *Rickettsia* species. In: *Journal of Bacteriology* 194 (10), S. 2751. DOI: 10.1128/JB.00299-12.
- Drehmann, M.; Springer, A.; Lindau, A.; Facht, K.; Mai, S.; Thoma, D. et al. (2020): The Spatial Distribution of *Dermacentor* Ticks (Ixodidae) in Germany—Evidence of a Continuing Spread of *Dermacentor reticulatus*. In: *Frontiers in veterinary science* 7, S. 578220. DOI: 10.3389/fvets.2020.578220.
- Ellison, D. W.; Clark, T. R.; Sturdevant, D. E.; Virtaneva, K.; Porcella, S. F.; Hackstadt, T. (2008): Genomic comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. In: *Infection and immunity* 76 (2), S. 542–550. DOI: 10.1128/IAI.00952-07.
- Faccini-Martínez, Á. A.; García-Álvarez, L.; Hidalgo, M.; Oteo, J. A. (2014): Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 28, S. 126–139. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.025.
- Felsheim, R. F.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G. (2009): Genome sequence of the endosymbiont *Rickettsia peacockii* and comparison with virulent *Rickettsia rickettsii*: identification of virulence factors. In: *PloS one* 4 (12), e8361. DOI: 10.1371/journal.pone.0008361.
- Fernández-Soto, P.; Díaz Martín, V.; Pérez-Sánchez, R.; Encinas-Grandes, A. (2009): Increased prevalence of *Rickettsia aeschlimannii* in Castilla y León, Spain. In: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28 (6), S. 693–695. DOI: 10.1007/s10096-008-0667-3.
- Fischer, S.; Spierling, N. G.; Heuser, E.; Kling, C.; Schmidt, S.; Rosenfeld, U. M. et al. (2018): High prevalence of *Rickettsia helvetica* in wild small mammal populations in Germany. In: *Ticks and tick-borne diseases* 9 (3), S. 500–505. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.01.009.
- Fournier, P.-E.; Grunnenberger, F.; Jaulhac, B.; Gastinger, G.; Raoult, D. (2000): Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. In: *Emerging infectious diseases* 6 (4), S. 389–392. DOI: 10.3201/eid0604.000412.
- Fournier, P.-E.; Roux, V.; Raoult, D. (1998): Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. In: *International journal of systematic bacteriology* 48 Pt 3, S. 839–849. DOI: 10.1099/00207713-48-3-839.

- Fournier, P.-E.; Dumler, J. S.; Greub, G.; Zhang, J.; Wu, Y.; Raoult, D. (2003): Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. In: *Journal of Clinical Microbiology* 41 (12), S. 5456–5465. DOI: 10.1128/JCM.41.12.5456-5465.2003.
- Fournier, P.-E.; El Karkouri, K.; Leroy, Q.; Robert, C.; Giumelli, B.; Renesto, P. et al. (2009): Analysis of the *Rickettsia africae* genome reveals that virulence acquisition in *Rickettsia* species may be explained by genome reduction. In: *BMC Genomics*. 2009 Apr 20;10:166. DOI: 10.1186/1471-2164-10-166.
- Franke, J.; Fritzsche, 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. In: *Applied and environmental microbiology* 76 (20), S. 6829–6836. DOI: 10.1128/AEM.01630-10.
- Gilles, J.; Just, Frank T.; Silaghi, C.; Pradel, I.; Passos, L. M. F.; Lengauer, H. et al. (2008): *Rickettsia felis* in fleas, Germany. In: *Emerging infectious diseases* 14 (8), S. 1294–1296. DOI: 10.3201/eid1408.071546.
- Gross, D.; Schäfer, G. (2011): 100th anniversary of the death of Ricketts: Howard Taylor Ricketts (1871-1910). The namesake of the Rickettsiaceae family. In: *Microbes and Infection* 13 (1), S. 10–13. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.09.008.
- Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
- 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. In: *International Journal of Medical Microbiology* 293 Suppl 37, S. 86–92. DOI: 10.1016/s1433-1128(04)80013-5.
- Hildebrandt, A.; Fritzsche, J.; Franke, J.; Sachse, S.; Dorn, W.; Straube, E. (2011): Co-circulation of emerging tick-borne pathogens in Middle Germany. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (5), S. 533–537. DOI: 10.1089/vbz.2010.0048.
- Ibarra, V.; Oteo, J. A.; Portillo, A.; Santibáñez, S.; Blanco, J. R.; Metola, L. et al. (2006): *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, S. 206–214. DOI: 10.1196/annals.1374.040.
- Jado, I.; Oteo, J. A.; Aldámiz, M.; Gil, H.; Escudero, R.; Ibarra, V. et al. (2007): *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. In: *Emerging infectious diseases* 13 (9), S. 1405–1407. DOI: 10.3201/eid1309.060186.
- Jansen, A.; La Scola, B.; Raoult, D.; Lierz, M.; Wichmann, O.; Stark, K.; Schneider, T. (2008): Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. In: *Emerging infectious diseases* 14 (12), S. 1961–1963. DOI: 10.3201/eid1412.080229.
- J. Stenos; N. B. Unsworth; S. R. Graves (2005): A highly sensitive and specific real-time pcr assay for the detection of spotted fever and typhus group rickettsiae. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73 (6), S. 1083–1085. Online verfügbar unter https://www.academia.edu/25213873/A_highly_sensitive_and_specific_real_time_PCR_assay_for_the_detection_of_spotted_fever_and_typhus_group_Rickettsiae?auto=citations&from=cover_page.

- Kakumanu, M. L.; Ponnusamy, L.; Sutton, H. T.; Meshnick, S. R.; Nicholson, W. L.; Apperson, C. S. (2016): Development and Validation of an Improved PCR Method Using the 23S-5S Intergenic Spacer for Detection of *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis* Ticks and Tissue Samples from Humans and Laboratory Animals. In: *Journal of Clinical Microbiology* 54 (4), S. 972–979. DOI: 10.1128/JCM.02605-15.
- Kelly, P. J.; Raoult, D.; Mason, P. R. (1991): Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 85 (3), S. 397–398. DOI: 10.1016/0035-9203(91)90303-g.
- Kubelová, M.; Papoušek, I.; Bělohlávek, T.; Bellocq, J. G. de; Baird, Stuart J. E.; Široký, P. (2015): Spotted fever group rickettsiae detected in immature stages of ticks parasitizing on Iberian endemic lizard *Lacerta schreiberi* Bedriaga, 1878. In: *Ticks and tick-borne diseases* 6 (6), S. 711–714. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.06.003.
- Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. In: *Molecular biology and evolution* 33 (7), S. 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054.
- Luce-Fedrow, A.; Mullins, K.; Kostik, A. P.; St John, H. K.; Jiang, J.; Richards, A. L. (2015): Strategies for detecting rickettsiae and diagnosing rickettsial diseases. In: *Future microbiology* 10 (4), S. 537–564. DOI: 10.2217/fmb.14.141.
- Madeddu, G.; Mancini, F.; Caddeo, A.; Ciervo, A.; Babudieri, S.; Maida, I. et al. (2012): *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. In: *Emerging infectious diseases* 18 (4), S. 702–704. DOI: 10.3201/eid1804.111583.
- Márquez, F. J. (2008): Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. In: *Experimental & applied acarology* 45 (3-4), S. 185–194. DOI: 10.1007/s10493-008-9181-7.
- Marrero, M.; Raoult, D. (1989): Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 40 (2), S. 197–199. DOI: 10.4269/ajtmh.1989.40.197.
- May, K.; Strube, C. (2014): Prevalence of Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp.) in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hamburg, Germany. In: *Parasitol Res* 113 (6), S. 2169–2175. DOI: 10.1007/s00436-014-3869-x.
- Mediannikov, O.; Matsumoto, K.; Samoylenko, I.; Drancourt, M.; Roux, V.; Rydkina, E. et al. (2008): *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58 (Pt 7), S. 1635–1639. DOI: 10.1099/ijss.0.64952-0.
- Melles, H. H.; Colombo, S.; Lemos, E. R. de (1999): Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células vero. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32 (5), S. 469–473. DOI: 10.1590/s0037-86821999000500001.

- Morganti, G.; Gavaudan, S.; Canonico, C.; Ravagnan, S.; Olivieri, E.; Diaferia, M. et al. (2017): Molecular Survey on Rickettsia spp., Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi Senu Lato, and Babesia spp. in Ixodes ricinus Ticks Infesting Dogs in Central Italy. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 17 (11), S. 743–748. DOI: 10.1089/vbz.2017.2154.
- Nilsson, K.; Jaenson, T. G.; Uhnoo, I.; Lindquist, O.; Pettersson, B.; Uhlén, M. et al. (1997): Characterization of a spotted fever group Rickettsia from Ixodes ricinus ticks in Sweden. In: *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1), S. 243–247. DOI: 10.1128/jcm.35.1.243-247.1997.
- Nilsson, K.; Elfving, K.; Pahlson, C. (2010): Rickettsia helvetica in patient with meningitis, Sweden, 2006. In: *Emerging infectious diseases* 16 (3), S. 490–492. DOI: 10.3201/eid1603.090184.
- Novakova, M.; Bulkova, A.; Costa, F. B.; Kristin, A.; Krist, M.; Krause, Frantisek et al. (2015): Molecular characterization of 'Candidatus Rickettsia vini' in Ixodes arboricola from the Czech Republic and Slovakia. In: *Ticks and tick-borne diseases* 6 (3), S. 330–333. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.02.006.
- Olivieri, E.; Wijnveld, M.; Bonga, M.; Berger, L.; Manfredi, M. T.; Veronesi, F.; Jongejan, F. (2018): Transmission of Rickettsia raoultii and Rickettsia massiliae DNA by Dermacentor reticulatus and Rhipicephalus sanguineus (s.l.) ticks during artificial feeding. In: *Parasites & vectors* 11 (1), S. 494. DOI: 10.1186/s13071-018-3075-2.
- Parola, P.; Paddock, C. D.; Raoult, D. (2005): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. In: *Clinical Microbiology Reviews* 18 (4), S. 719–756. DOI: 10.1128/CMR.18.4.719-756.2005.
- Parola, Philippe; Paddock, Christopher D.; Socolovschi, Cristina; Labruna, Marcelo B.; Mediannikov, Oleg; Kernif, Tahar et al. (2013): Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. In: *Clinical Microbiology Reviews* 26 (4), S. 657–702. DOI: 10.1128/CMR.00032-13.
- Parola, Philippe; Rovey, Clarisse; Rolain, Jean Marc; Brouqui, Philippe; Davoust, Bernard; Raoult, Didier (2009): Rickettsia slovaca and R. raoultii in tick-borne Rickettsioses. In: *Emerging infectious diseases* 15 (7), S. 1105–1108. DOI: 10.3201/eid1507.081449.
- Pérez-Osorio, Carlos E.; Zavala-Velázquez, Jorge E.; Arias León, Juan José; Zavala-Castro, Jorge E. (2008): Rickettsia felis as emergent global threat for humans. In: *Emerging infectious diseases* 14 (7), S. 1019–1023. DOI: 10.3201/eid1407.071656.
- Philip, R. N.; Casper, E. A.; Ormsbee, R. A.; Peacock, M. G.; Burgdorfer, W. (1976): Microimmunofluorescence test for the serological study of rocky mountain spotted fever and typhus. In: *Journal of Clinical Microbiology* 3 (1), S. 51–61. DOI: 10.1128/jcm.3.1.51-61.1976.
- Philippsthal, A. (1918): Epidemiologische und hygienische Mitteilungen über eine Fleckfieberepidemie. In: *Med Microbiol Immunol* 87 (1), S. 451–467. DOI: 10.1007/BF02285040.

- Pichon, B.; Kahl, O.; Hammer, B.; Gray, J. S. (2006): Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 6 (4), S. 382–387. DOI: 10.1089/vbz.2006.6.382.
- Pluta, S.; Tewald, F.; Hartelt, K.; Oehme, R.; Kimmig, P.; Mackenstedt, U. (2009): *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. In: *Emerging infectious diseases* 15 (12), S. 2077–2078. DOI: 10.3201/eid1512.090843.
- Portillo, A.; Sousa, R. de; Santibáñez, S.; Duarte, A.; Edouard, S.; Fonseca, I. P. et al. (2017): Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 17 (1), S. 23–32. DOI: 10.1089/vbz.2016.1966.
- Raoult, D.; Dutour, O.; Houhamdi, L.; Jankauskas, R.; Fournier, P. E.; Ardagna, Y. et al. (2006): Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. In: *The Journal of infectious diseases* 193 (1), S. 112–120. DOI: 10.1086/498534.
- Raoult, D.; Fournier, P.-E.; Abboud, P.; Caron, F. (2002): First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. In: *Emerging infectious diseases* 8 (7), S. 748–749. DOI: 10.3201/eid0807.010480.
- Reháček, J.; Liebisch, A.; Urvölgyi, J.; Kováčová, E. (1977): *Rickettsiae* of the spotted fever isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in South Germany. In: *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie* 239 (2), S. 275–281.
- Richter, J.; Fournier, P.-E.; Petridou, J.; Häussinger, D.; Raoult, D. (2002): *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. In: *Emerging infectious diseases* 8 (2), S. 207–208. DOI: 10.3201/eid0802.010293.
- Rieg, S.; Schmoldt, S.; Theilacker, C.; With, K. de; Wölfel, S.; Kern, W. V.; Döbler, G. (2011): Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. In: *BMC infectious diseases* Jun 10;11:167. DOI: 10.1186/1471-2334-11-167.
- Roux, V.; Raoult, D. (2000): Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). In: *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 50 Pt 4, S. 1449–1455. DOI: 10.1099/00207713-50-4-1449.
- Rumer, L.; Graser, E.; Hillebrand, T.; Talaska, T.; Dautel, H.; Mediannikov, O. et al. (2011): *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma marginatum* ticks, Germany. In: *Emerging infectious diseases* 17 (2), S. 325–326. DOI: 10.3201/eid1702.100308.
- Sahni, A.; Fang, R.; Sahni, S. K.; Walker, D. H. (2019): Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. In: *Annual review of pathology* 14, S. 127–152. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800.

- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *Journal of molecular biology* 94 (3), S. 441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Schex, S.; Dobler, G.; Riehm, J.; Müller, J.; Essbauer, S. (2011): Rickettsia spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 11 (5), S. 493–502. DOI: 10.1089/vbz.2010.0060.
- Schmolz, G.; Oehme, R.; Kimmig, P. (2015): Vektorübertragene Erkrankungen. In: *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 77 (10), 775-89; quiz 790. DOI: 10.1055/s-0035-1552749.
- Schorn, S.; Pfister, K.; Reulen, H.; Mahling, M.; Silaghi, C. (2011): Occurrence of Babesia spp., Rickettsia spp. and Bartonella spp. in Ixodes ricinus in Bavarian public parks, Germany. In: *Parasites & vectors* 4, S. 135. DOI: 10.1186/1756-3305-4-135.
- Selmi, R.; Ben Said, M.; Ben Yahia, H.; Abdelaali, H.; Messadi, L. (2020): Molecular epidemiology and phylogeny of spotted fever group Rickettsia in camels (Camelus dromedarius) and their infesting ticks from Tunisia. In: *Transboundary and emerging diseases* 67 (2), S. 733–744. DOI: 10.1111/tbed.13392.
- Silaghi, C.; Gilles, J.; Höhle, M.; Pradel, I.; Just, F. T.; Fingerle, V. et al. (2008): Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in Southern Germany. In: *Journal of medical entomology* 45 (5), S. 948–955. DOI: 10.1603/0022-2585(2008)45[948:posfgr]2.0.co;2.
- Silaghi, C.; Hamel, D.; Thiel, C.; Pfister, K.; Pfeffer, M. (2011): Spotted fever group rickettsiae in ticks, Germany. In: *Emerging infectious diseases* 17 (5), S. 890–892. DOI: 10.3201/eid1705.101445.
- Silaghi, C. (2008): Prevalence and genetic analysis of Anaplasma phagocytophilum and spotted fever group rickettsiae in the tick Ixodes ricinus in urban and periurban sites in Southern Germany. Zugl.: München, Univ., Diss., 2008. VVB Laufersweiler, Gießen.
- Simser, J. A.; Palmer, A. T.; Fingerle, V.; Wilske, B.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G. (2002): Rickettsia monacensis sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (Ixodes ricinus) collected in a European city park. In: *Applied and environmental microbiology* 68 (9), S. 4559–4566. DOI: 10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002.
- Spiegel, Der (2019): Eingeschleppte Hyalomma-Zecke: Riesenzecke überträgt erstmals Fleckfieber in Deutschland. In: *DER SPIEGEL*, 14.08.2019. Online verfügbar unter <https://www.spiegel.de/gesundheit/diagnose/hyalomma-in-siegen-riesenzecke-infiziert-pferdewirt-mit-fleckfieber-a-1281939.html>, zuletzt geprüft am 29.08.2022.
- Sprong, H.; Fonville, M.; van Docters Leeuwen, A.; Devillers, E.; Ibañez-Justicia, A.; Stroo, A. et al. (2019): Detection of pathogens in Dermacentor reticulatus in northwestern Europe: evaluation of a high-throughput array. In: *Heliyon* 5 (2), e01270. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01270.
- Stranneheim, H.; Lundberg, J. (2012): Stepping stones in DNA sequencing. In: *Biotechnology Journal* 7 (9), S. 1063–1073. DOI: 10.1002/biot.201200153.

- Tamura, K.; Nei, M. (1993): Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. In: *Molecular biology and evolution* 10 (3), S. 512–526. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Vitale, G.; Mansuelo, S.; Rolain, J.-M.; Raoult, D. (2006): Rickettsia massiliae human isolation. In: *Emerging infectious diseases* 12 (1), S. 174–175. DOI: 10.3201/eid1201.050850.
- Wächter, M.; Wölfel, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G.; Kohn, B.; Moritz, A. et al. (2015): Serological differentiation of antibodies against Rickettsia helvetica, R. raoultii, R. slovaca, R. monacensis and R. felis in dogs from Germany by a micro-immunofluorescent antibody test. In: *Parasites & vectors* 8, S. 126. DOI: 10.1186/s13071-015-0745-1.
- Walker, D. H.; Ismail, N. (2008): Emerging and re-emerging rickettsioses: endothelial cell infection and early disease events. In: *Nature reviews. Microbiology* 6 (5), S. 375–386. DOI: 10.1038/nrmicro1866.
- Wetter und Klima - Deutscher Wetterdienst - Basisfakten zum Klimawandel (2022). Online verfügbar unter https://www.dwd.de/DE/klimaumwelt/klimawandel/klimawandel_node.html, zuletzt aktualisiert am 24.09.2022, zuletzt geprüft am 24.09.2022.
- Whitman, W. B. (Hg.) (2011): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Second Edition. New York, NY: Bergey's Manual Trust. S. 97 - 116
- Wimbauer, M.; Bakkes, D. K.; Wölfel, S.; Bröker, M.; Schaper, S.; Rieß, R. et al. (2022): Rickettsia spp. in ticks (Acari: Ixodidae) from wild birds: First detection of Candidatus Rickettsia vini in Hesse, Germany. In: *Ticks and tick-borne diseases* 13 (3), S. 101908. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2022.101908.
- Wölfel, R.; Terzioglu, R.; Kiessling, J.; Wilhelm, S.; Essbauer, S.; Pfeffer, M.; Dobler, G. (2006): Rickettsia spp. in Ixodes ricinus ticks in Bavaria, Germany. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, S. 509–511. DOI: 10.1196/annals.1374.133.
- Wölfel, R.; Essbauer, S.; Dobler, G. (2008): Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglected disease. In: *International Journal of Medical Microbiology* 298, S. 368–374. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.11.009.
- Wölfel, S.; Speck, S.; Essbauer, S.; Thoma, B. R.; Mertens, M.; Werdermann, S. et al. (2017): High seroprevalence for indigenous spotted fever group rickettsiae in forestry workers from the federal state of Brandenburg, Eastern Germany. In: *Ticks and tick-borne diseases* 8 (1), S. 132–138. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.009.

Anhang:

Liste Material

Geräte

Brutschränke

Modell 700 (NIZK)	Memmert
Hareus (IKZ)	ThermoFisher Scientific

Elektrophorese

ChemiDoxXRS (Kamera)	Biorad
RunOne Electrophoresis Cell	Embitec
Feinwaage	Satorius
Mikrowelle	Bosch

Gewebshomogenisierung

FastPrep 24	MP Biomedical
Magna Pure LC	Roche

Gefrier - und Kühlschränke

Liebherr

Mikroskope

Floureszenzmikroskop DMS5000	Leica
Mikroskope (insvers)	
Stemi DU4 (Stereolupe Zecken sortieren)	Zeis
DMIL LED (NIZK)	Leica
AE21 (IZK)	Motic

PCR

GeneAmp PCR System 2004	Perkin Elmer
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Light Cyclor 1.5	Roche

Pipetten

Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann
Pipetten	Eppendorf

Zentrifugen

Biofuge pico (Probenaufbereitung)	Heraeus
Minspin plus (Cyclerraum)	Eppendorf
LC Carousel Centrifuge	Roche
5424 R (Gelraum DNA –Aufr.)	Eppendorf
Rotata 460R (Shell Vial Zentrifuge)	Hettich
Galaxy Mini Star	VWR

Reagenzien**Gelelektrophorese**

TAE Puffer 50x	PanReac AppliChem
Argarose	Roth
Gelred	Biotoum
Ladder	Invitrogen

IIFT

Antikörper SFG IgG	Fuller Laboratories
Konjugat	Dako
PBS	Euroimmun ZF
Tween	PanReac AppliChem
Formalin	Merk
Aceton	Roth
Methanol	Sigma Aldrich
Evansblue	Biomeril
Fluorescent Mounting Medium	Dako

Kits

Magna Pure Kit	Roche
DNA FastStartHybProbe (Real-Time-PCR)	Roche
Platinum Taq Polimerase (konventionelle PCR)	Invitrogen

QIAQuick PCR Purification Kit Qiagen

Primer/Sonden

Primer und Sonden von Invitrogen gelöst in 10µl DNase freiem Wasser, gelagert bei -20°C in 30µl Aliquots.

PanRickPrimer plus Taq Roche

HelvPCR 23S Primer plus Taq Roche

OmpA/B Primer, 16S/23S Primer plus PlatinumTaq Invitrogen

Rickettsienstämme für Positivkontrollen (PCR)

AS 819 R. helvetica

Zellkultur

FKS Gibco

MEM Gibco

NEAA Gibco

Antibiotikum/Antimykotikum Gibco

Zelllinien

VeroE6 American Type Culture Collection (ATCC)

Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen Thermofisher Scientific

Lysing Matrix A Tubes MP Biomedical

LightCycler Glaskapillaren Roche

Miniatureaktionsgefäße (1,5 ml) Eppendorf

Pipettenspitzen PEQLAD Safeguard PEQLab Biotechnologie GmbH

Pipettenspitzen ArtGel gestopft Thermofisher Scientific

Pipettenspitzen Pipettboy Falcon

Platten Magna Pure Roche

Reaktionsgefäße (50 ml) Falcon

Shell Vials

SterilinUK

Zellkulturflaschen

ThermoFisher Scientific

Zellschaber Corning

Corning Incorporated

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Josef Eberle (Max von Pettenkofer Institut, München) für die Übernahme dieser extern durchgeführten Doktorarbeit und die Bereitschaft, diese trotz längerer Pausen in der Bearbeitung bis zum Abschluss zu begleiten.

Ich danke im Besonderen Prof. Dr. med. Gerhard Dobler vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München für die Bereitstellung des Themas und seine freundliche aber bestimmte Art mich stetig in der Durchführung der Laboruntersuchungen sowie der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit zu motivieren und diese mit großer Geduld zu unterstützen.

Dr. med. Silke Wölfel danke ich herzlichst für die äußerst kompetente Einführung in die Welt der Wissenschaft sowie die liebevolle Betreuung und Unterstützung insbesondere im praktischen Teil der Dissertation.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr möchte ich für die äußerst freundliche Aufnahme in das Team, sowie die Unterstützung bei kleineren und größeren Problemen in der Durchführung der Laborarbeiten und darüber hinaus, herzlich danken.

Meiner gesamten Familie und meinen Freunden danke ich für die vielfältige Unterstützung mental, emotional und auch praktisch über die Jahre.

Von Herzen gilt mein besonderer Dank meinem Ehemann Wolfgang, der mich durchgehend mit liebevoller Strenge motiviert und alle Höhen und Tiefen geduldig mit mir durchgestanden hat. Seine Unterstützung und sein Vertrauen in mich haben einen großen Anteil am Erfolg dieser Arbeit.

Affidavit



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Bauer, Veronika

Name, Vorname

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

„Nachweis von Rickettsien in Zecken aus der Region Mühldorf/Inn, Oberbayern“

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.

Dillingen an der Donau, 21.06.2023

Veronika Bauer

Ort, Datum
Doktorand

Unterschrift Doktorandin bzw.

Publikationsliste

Nachweis von Rickettsien in Zecken aus der Region Mühldorf/Inn, Oberbayern

Veronika Keller, Gerhard Dobler, Josef Eberle, Silke Wölfel

Vortrag 2. Süddeutscher Zeckenkongress, 17./18. März 2014, Schloss Hohenheim Stuttgart

Keller V, Dobler G, Eberle J, Wölfel S. Detection and Differentiation of Rickettsia sp. in ticks in Mühldorf am Inn in Eastern Bavaria. ESCCAR International Congress on Rickettsia and other Intracellular Bacteria 2015, 13.-16-06.2015, Lausanne, Switzerland

First detection of Rickettsia monacensis in Denmark

Silke Wölfel, Lidia Chitimia- Dobler, Gerhard Dobler, Veronika Keller, Per Moestrup Jensen,

Sigurdur Skarphedinsson, Nanna Skaarup Andersen

ESCCAR meeting in Marseille 2017 Silke Wölfel