

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

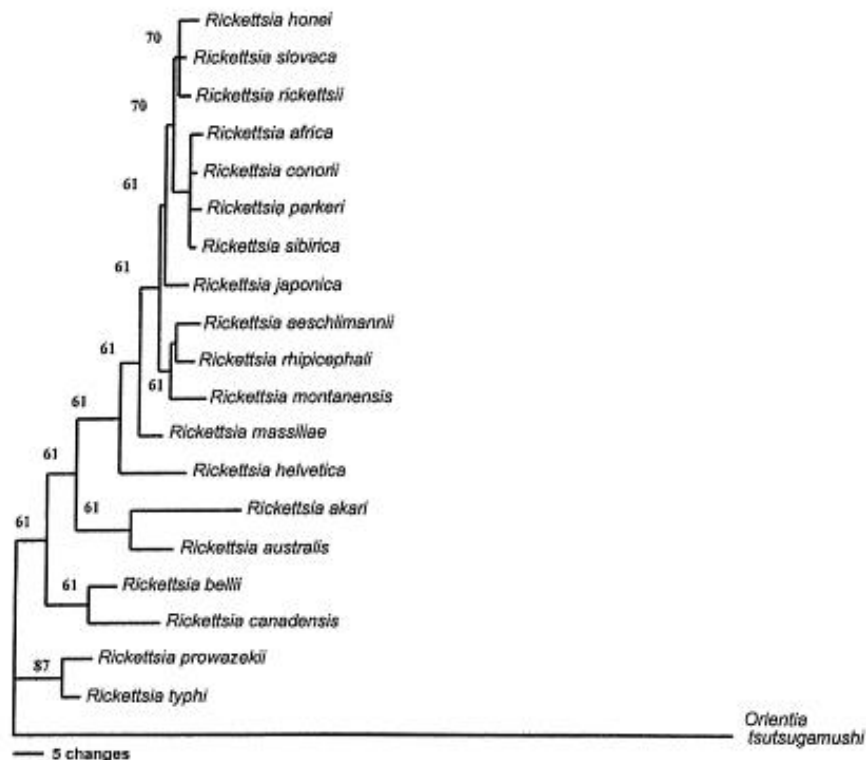


FIGURE BXII.α.35. Phylogenetic relationships of the organisms in the Family Rickettsiaceae based on the DNA sequences of the 16S rRNA genes (GenBank accession numbers: *R. aeschlimannii*, RAU74757; *R. africa*, R1RRGDA; *R. akari*, RAU12458; *R. australis*, RAU17644; *R. bellii*, RBU11014; *R. canadensis*, RCU15162; *R. conorii*, R1RRGDH; *R. helvetica*, R1RRGDK; *R. honei*, AF060705; *R. japonica*, R1RRGDI; *R. massiliae*, R1RRGDI; *R. montanensis*, R1RRGDN; *R. parkeri*, R1RRRDA; *R. prowazekii*, R1RCGSA; *R. rhipicephali*, R1RRGDO; *R. rickettsii*, R1RRGDP; *R. sibirica*, R1RRS16SRG; *R. slovaca*, 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 Patientmaterial 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.

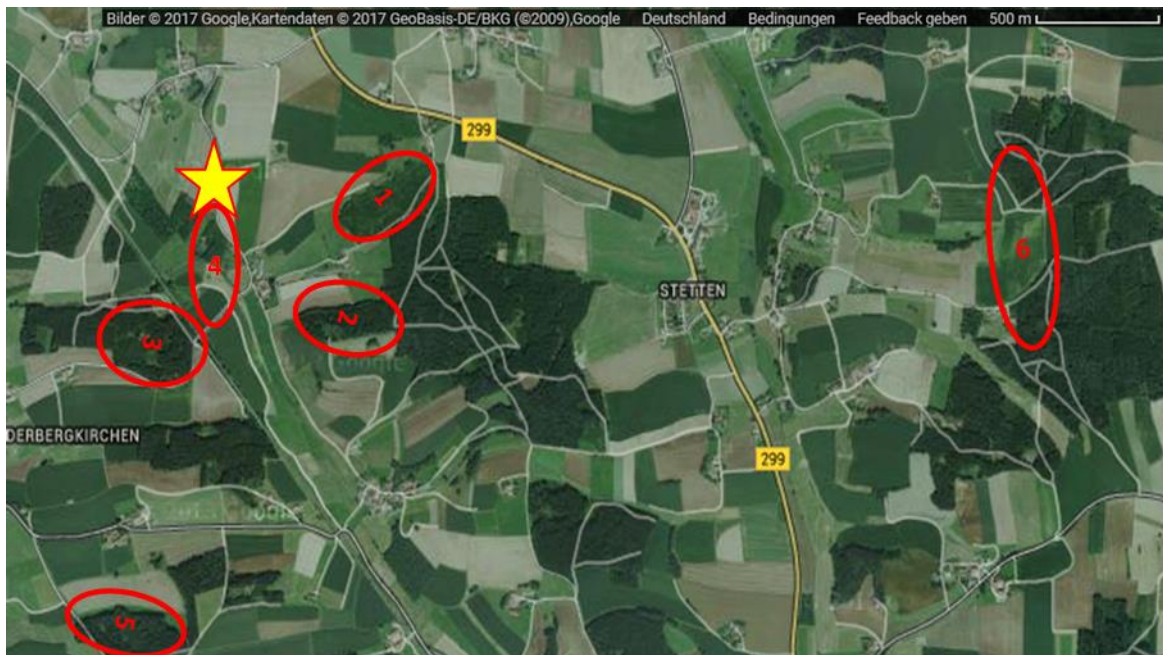


Abbildung 4 Lage der Standorte



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 μ l 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 Gewebekomogenisation

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 Waschschritten 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.

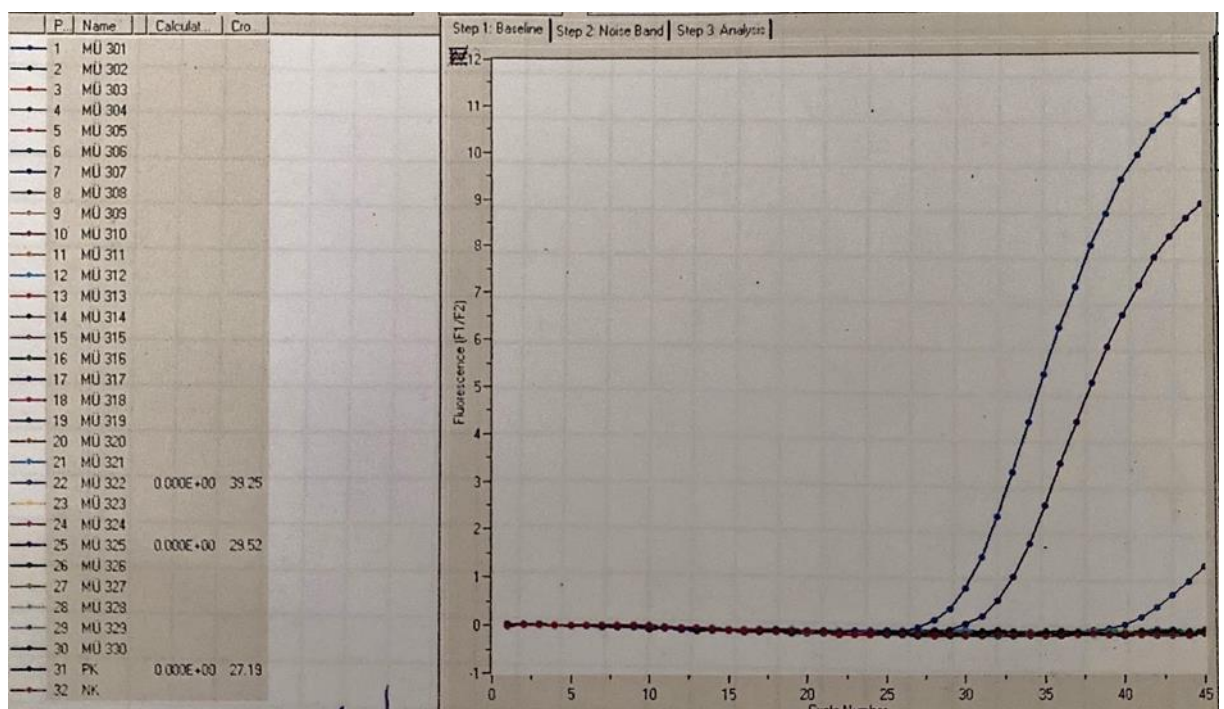


Abbildung 8 Beispiel Grafik Real-Time-PCR und CT-Werte

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 Basenpaare |
|-----|------------------|---|-------------------|
| 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 Hybridization 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.

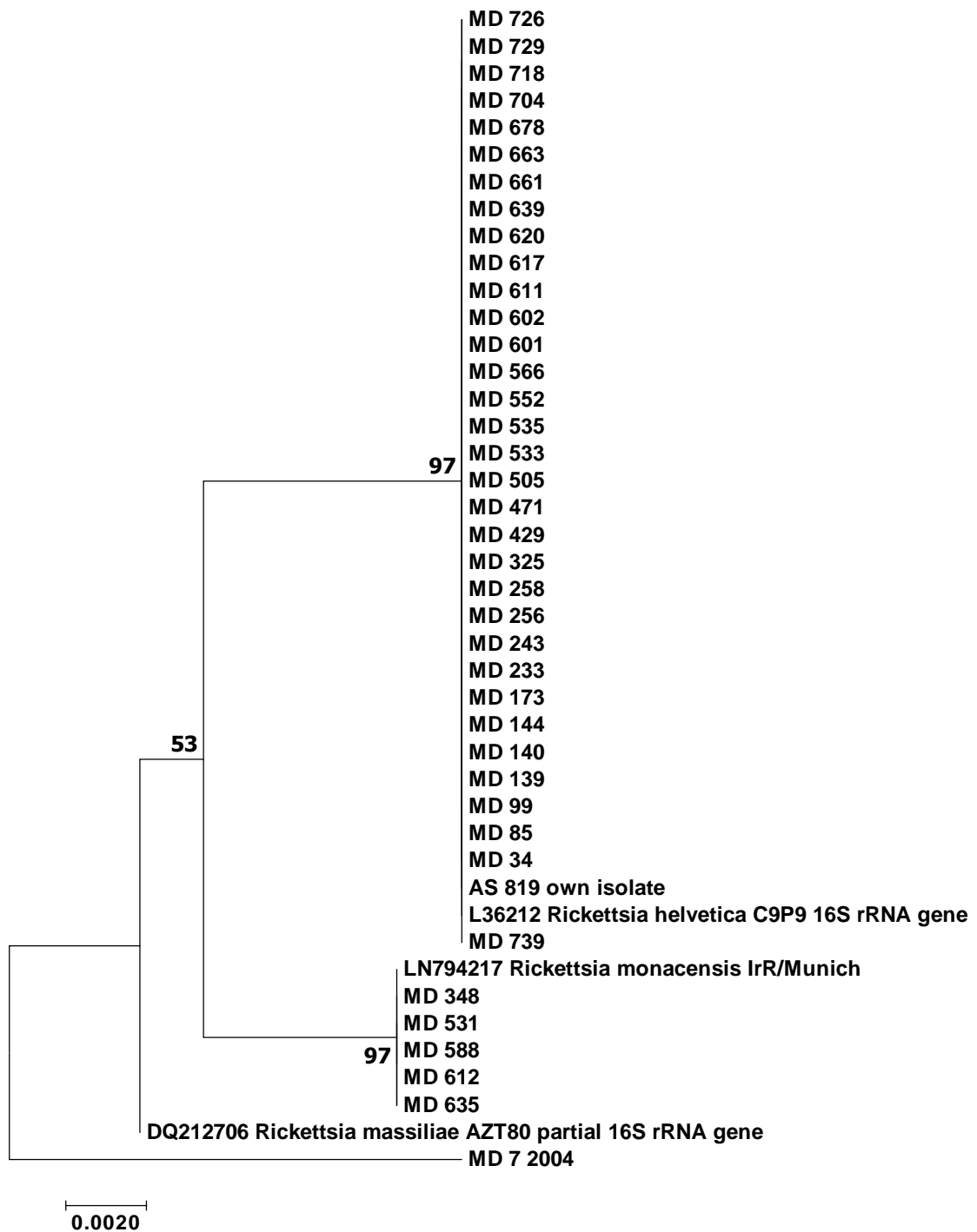


Abbildung 10 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen 16S rDNA Gens

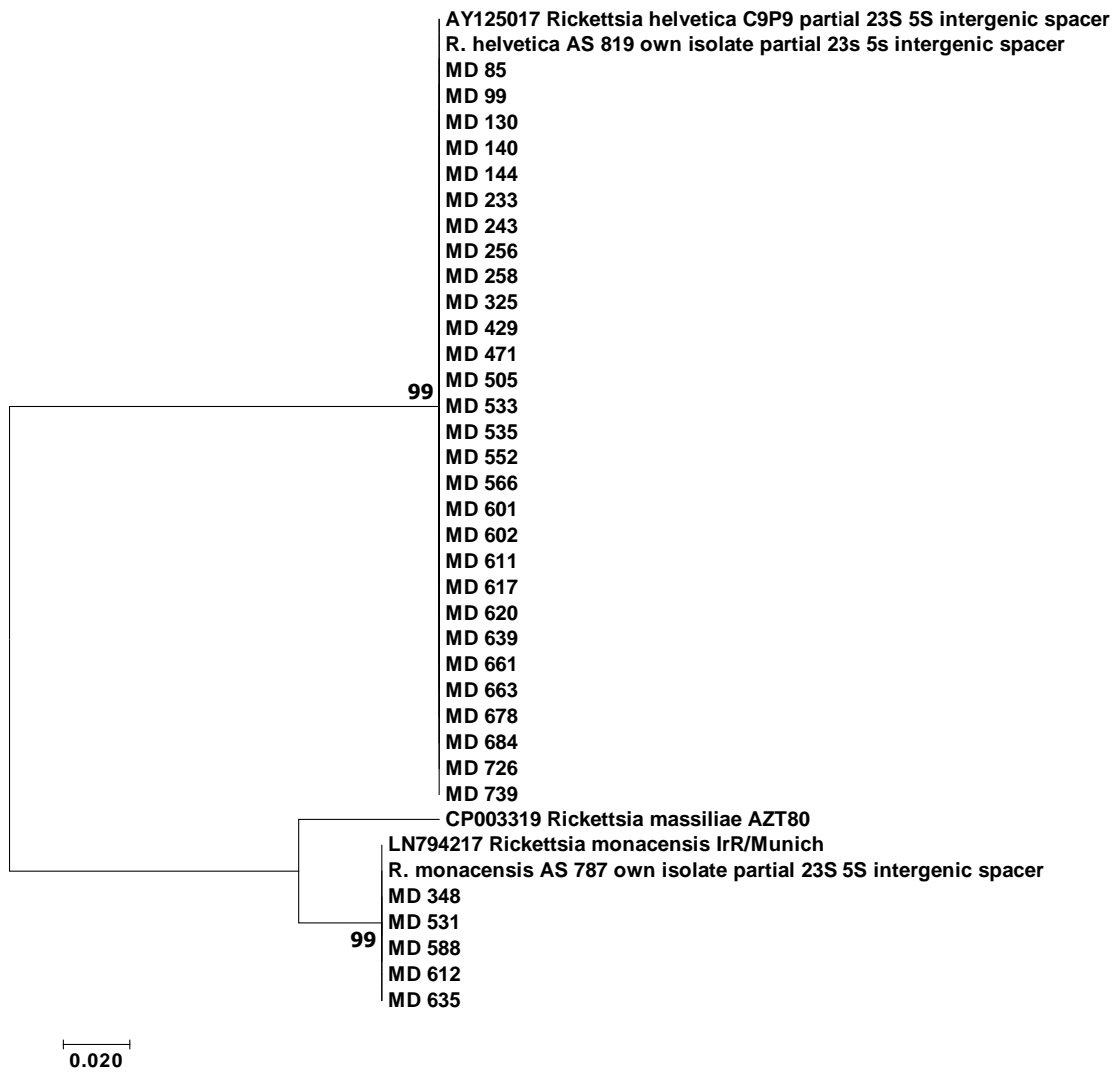


Abbildung 11 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse der 5S-23S intergenic spacer region

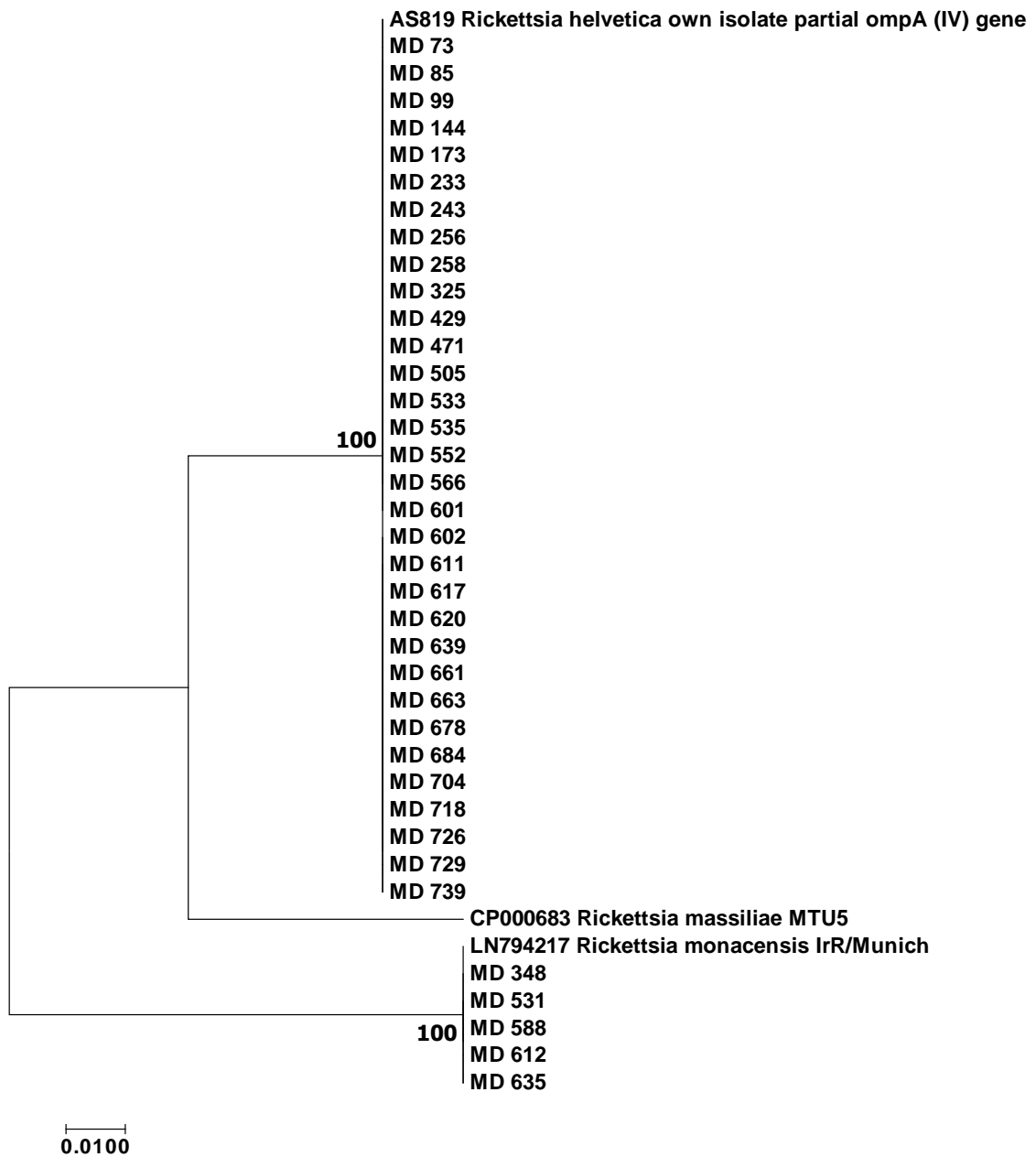


Abbildung 12 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompA (Fragment IV) Gens

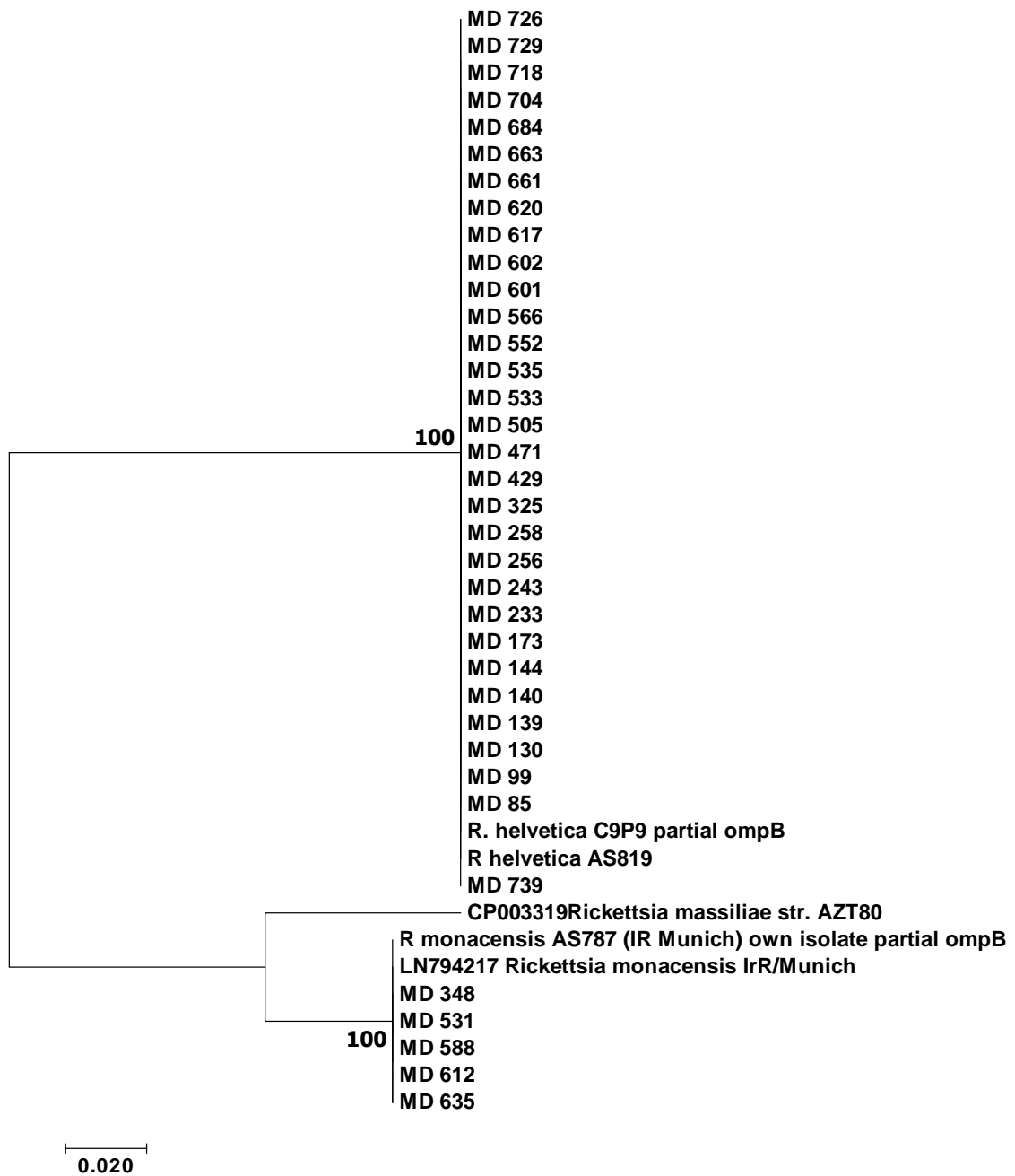


Abbildung 13 Auf den verfügbaren rickettsialen molekularbiologischen Sequenzdaten beruhende phylogenetische Analyse des partiellen ompB Gens

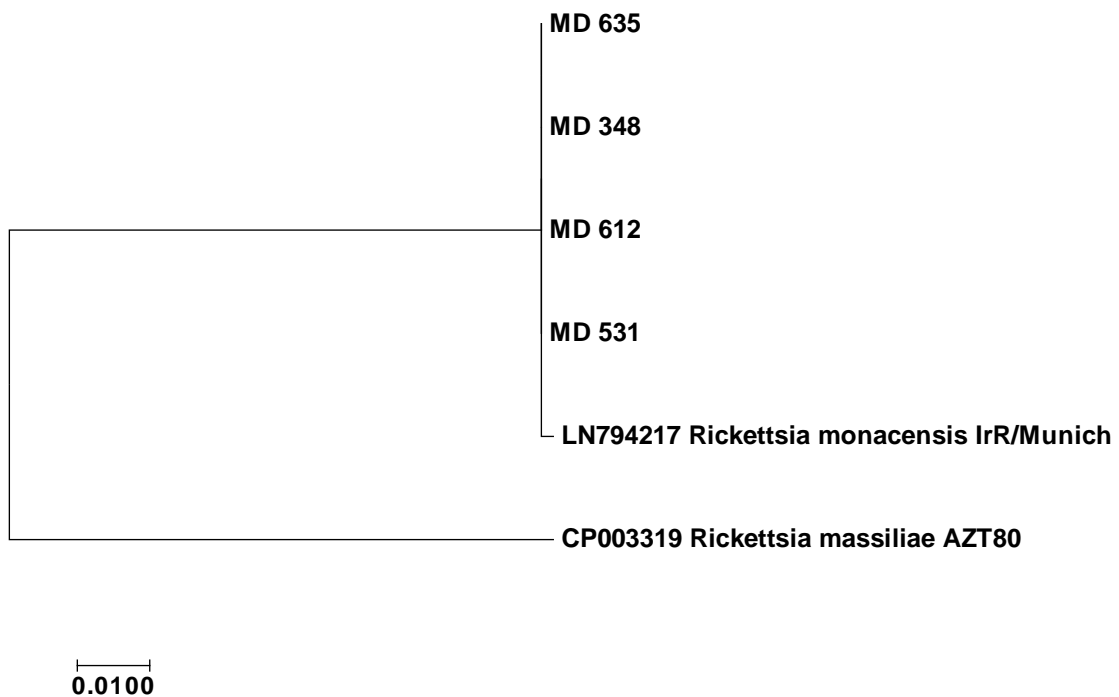


Abbildung 14 Phylogenetischer Stammbaum der verfügbaren Sequenzen von *Rickettsia monacensis* (aus Mühldorf) des partiellen ompA (Fragment I) Gens von *Rickettsia monacensis*

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

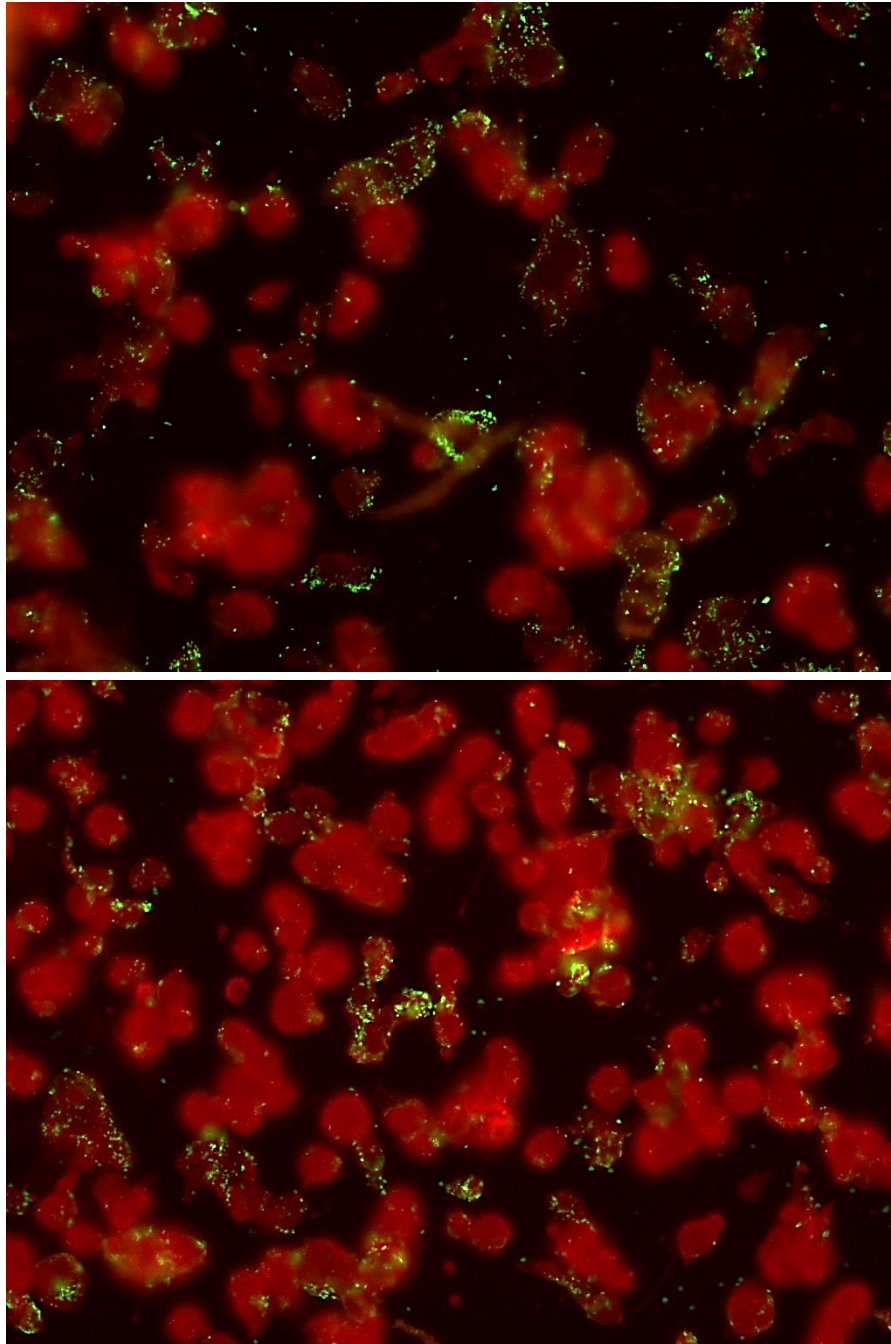
sich im mikroskopischen Bild nicht bei allen Proben die nach den PCR-Ergebnissen erwartete quantitativ höhere Anzahl an nachgewiesenen Rickettsien.

| 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



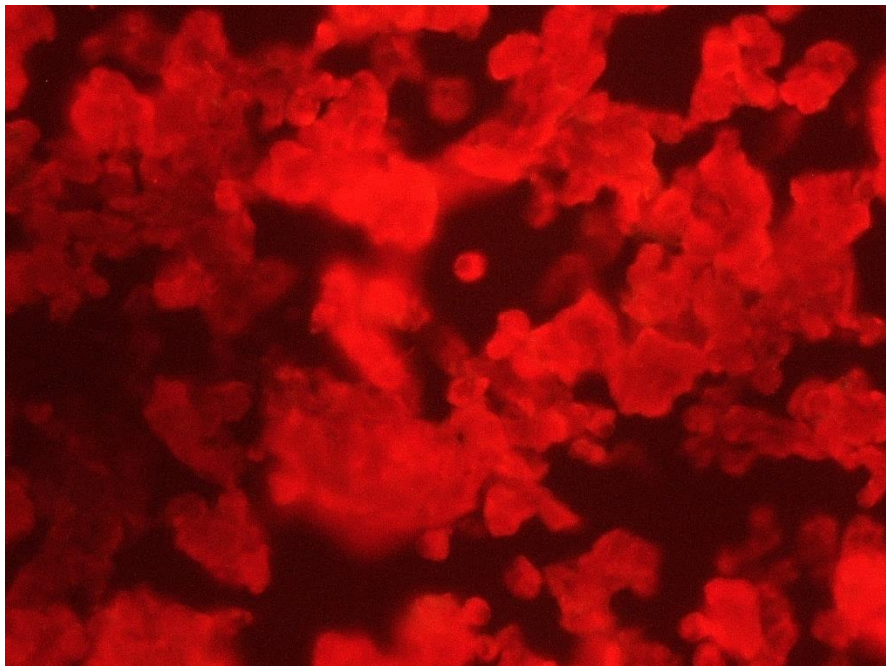
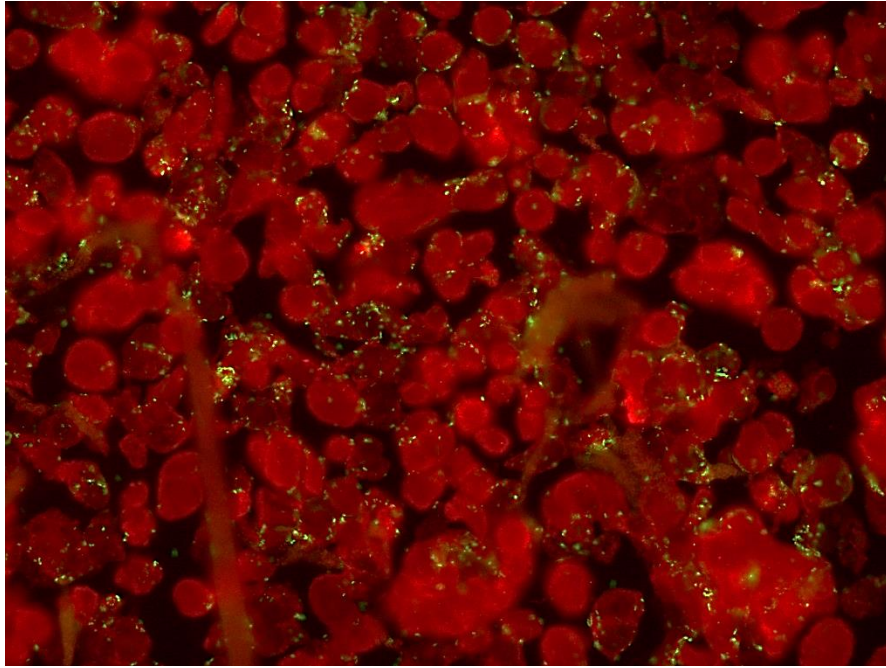
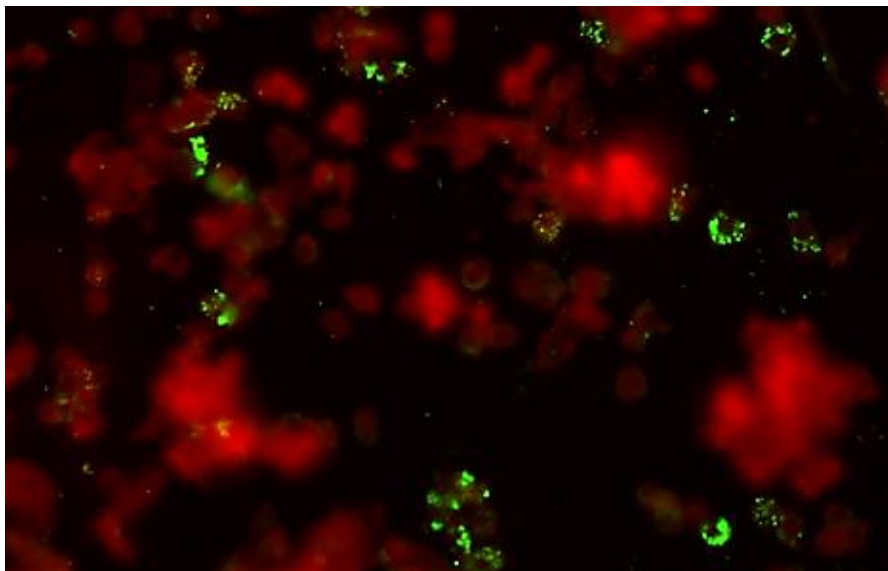
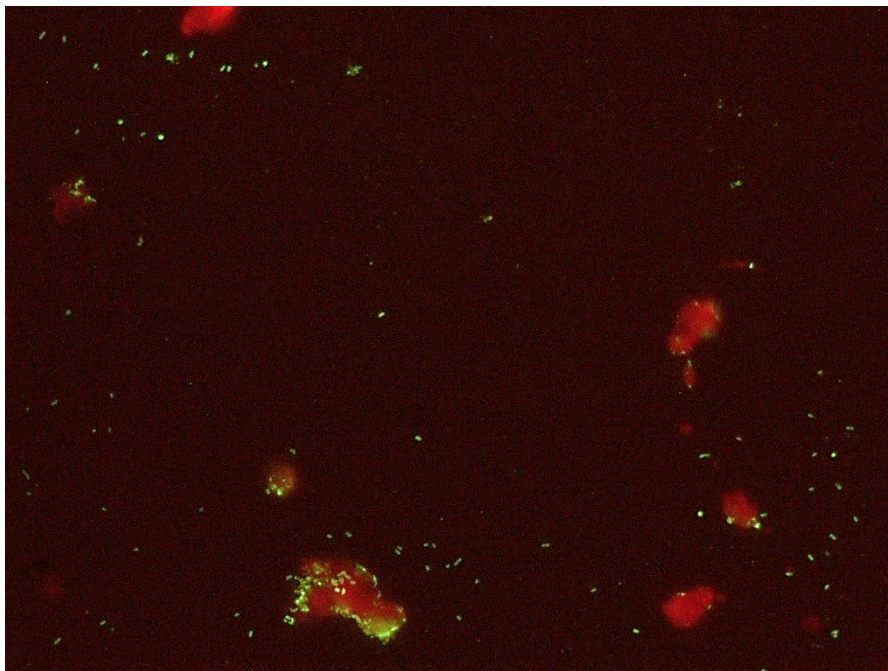
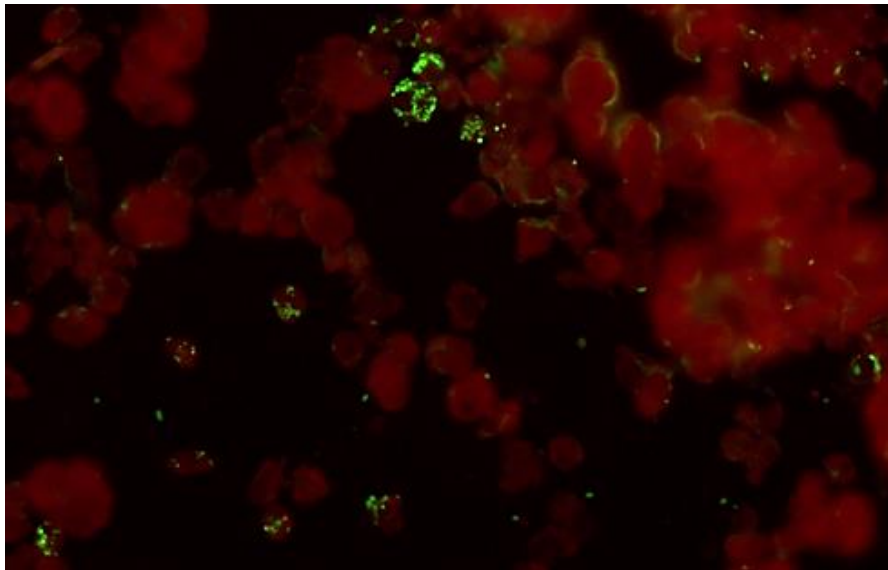


Abbildung 15 Anzuchtkontrolle mittels IIFT *R. monacensis*

(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



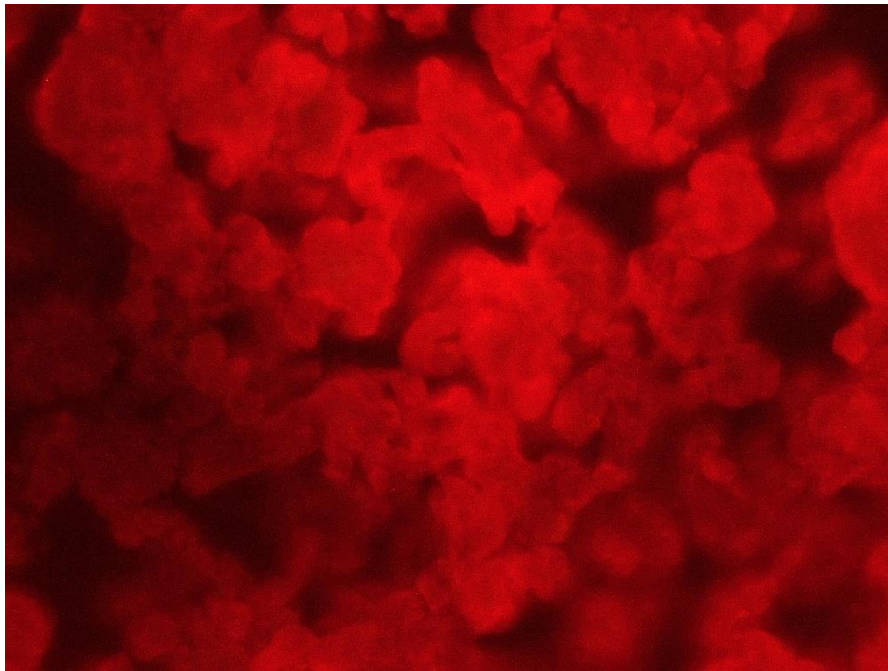


Abbildung 16 Anzuchtkontrolle mittels IIFT *R. helvetica*

(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 Südost-Bayern 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 unbekannte 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 hochsensitive, 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.; Lundeberg, 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 Cyclers 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 Castor

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.

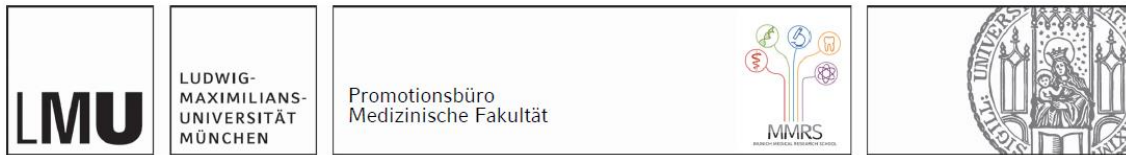
Dr. med. Silke Wölfel danke ich herzlichst für die äußerst kompetente Einführung in die Welt der Wissenschaft sowie die liebevolle Betreuung und Unterstützung insbesondere im praktischen Teil der Dissertation.

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



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