

Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Babesia* spp. in
Ixodes ricinus-Zecken im Naherholungsgebiet Zeitgrund in Thüringen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem ~~Rektor~~ der ~~Medizinischen Fakultät~~
der ~~Friedrich-Schiller-Universität~~ ~~ena~~

von ~~Katharina Paulik~~

geboren am ~~0.0.0~~ in ~~ena~~

Gutachter

- 1.** Prof. Dr. med. Eberhard Straube, Universitätsklinikum Jena
- 2.** Prof. Dr. med. Gert Hein, Universitätsklinikum Jena
- 3.** Prof. Dr. med. Gerold Stanek, Universität Wien

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2009

Meiner Familie gewidmet

Von allen Geschenken,
die uns das Schicksal gewährt,
gibt es kein größeres Gut
als die Familie -
keinen größeren Reichtum,
keine größere Freude.

Epikur von Samos
griech. Philosoph

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung	3
2.1 <i>Ixodes ricinus</i> L-Zecken	3
2.1.1 Morphologie	3
2.1.2 Entwicklungszyklus, Wirtsbefall	4
2.1.3 Aktivität und Biotop	6
2.1.4 Saugakt, übertragbare Erreger	6
2.1.5 Prophylaxe.....	8
2.1.6 Zeckenentfernung	9
2.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	9
2.2.1 Definition, Geschichte, Klassifizierung	9
2.2.2 Morphologie	10
2.2.3 Übertragung, Pathogenität.....	11
2.2.4 Epidemiologie (Prävalenzen)	11
2.2.5 Borreliose: Klinisches Bild, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe	12
2.3 <i>Babesia</i> spp.: <i>B. microti</i> und <i>B. divergens</i>	15
2.3.1 Definition, Geschichte, Klassifizierung	15
2.3.2 Morphologie	16
2.3.3 Übertragung	16
2.3.4 Epidemiologie (Prävalenzen)	17
2.3.5 Humane Babesiose: Klinik, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe	17
3 Zielsetzung der Arbeit	19
4 Methoden	21
4.1 Sammeln der Zecken	21
4.2 DNA-Extraktion	23
4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	24
4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) allgemein	25
4.4.1 Borrelien Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
4.4.2 Babesien Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
4.5 Agarose-Gelelektrophorese	31
4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese allgemein.....	31

4.5.2	Borrelien-Gelelektrophorese	32
4.5.3	Babesien-Gelelektrophorese.....	32
4.6	Restriktionsverdau allgemein	32
4.6.1	Borrelien Restriktionsverdau	33
4.6.2	Babesien Restriktionsverdau.....	35
4.7	Sequenzierung	36
4.8	Statistik.....	38
5	Materialien.....	39
5.1	DNA-Extraktion.....	39
5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung	39
5.3	PCR.....	39
5.4	Gelelektrophorese	41
5.5	Restriktionsverdau Borrelien	41
5.6	Restriktionsverdau Babesien.....	42
5.7	DNA-Extraktion aus dem Gel	42
5.8	Sequenzierung	42
5.9	Software	42
6	Ergebnisse	43
6.1	Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	43
6.2	Methodenevaluation	44
6.3	Borrelienuntersuchungen	46
6.3.1	Ergebnisse der Borrelien-PCR durch Amplifikation des <i>ospA</i> -Gens ...	46
6.3.2	Borrelien-Typisierung durch RFLP-Analyse des <i>ospA</i> -Gens.....	47
6.3.3	Borrelien-Sequenzierung	51
6.4	Doppelinfectionen Borrelien	52
6.5	Babesienuntersuchungen.....	54
6.5.1	Ergebnisse der Babesien-PCR	54
6.5.2	Babesientypisierung, Restriktionsverdau	56
6.5.3	Speziesdifferenzierung.....	56
6.6	Überblick Prävalenzen	57
6.7	Borrelien-Prävalenzen.....	60
6.7.1	Infektionsraten.....	60
6.7.2	Entwicklungsstadien.....	63
6.7.3	Saisonale Abhängigkeit.....	64

6.7.4	Abhängigkeit vom Wetter	66
6.7.5	Speziesdifferenzierung/Subtypen.....	67
6.8	Babesien-Prävalenzen	70
6.8.1	Infektionsraten.....	70
6.8.2	Entwicklungsstadien.....	73
6.8.3	Saisonale Abhängigkeit.....	75
6.8.4	Abhängigkeit vom Wetter	76
6.8.5	Speziesdifferenzierung/Subtypen.....	76
6.9	Prävalenzen Koinfektionen.....	77
6.9.1	Koinfektionen Babesien/Borrelien	77
6.9.2	Mehrfachinfektionen mit Borrelien, Babesien, Anaplasmen und Rickettsien.....	78
6.10	Statistische Ergebnisbetrachtung	80
7	Diskussion	81
7.1	Borrelien.....	81
7.1.1	Prävalenz	81
7.1.2	Spezies-und OspA-Typenverteilung.....	83
7.1.3	Ausblick.....	85
7.2	Babesien	90
7.2.1	Prävalenz	90
7.2.2	Typisierung.....	92
7.2.3	Ausblick.....	93
7.3	Koinfektionen	94
7.3.1	Prävalenzen	94
7.3.2	Bewertung.....	95
7.4	Kritische Schlussbetrachtung der eigenen Methoden	95
7.5	Schlussfolgerungen.....	97
	Literaturverzeichnis	100
	Abbildungsverzeichnis.....	110
	Tabellenverzeichnis	111
	Anhang	112
	Danksagung	115
	Lebenslauf/Publicationen	116
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	118

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (Aqua destillata)
B.	<i>Borrelia</i> od. <i>Babesia</i>
bp	Basenpaare
<i>Babesia</i> spp.	<i>Babesia</i> Spezies
<i>B. microti</i>	<i>Babesia microti</i>
<i>B. divergens</i>	<i>Babesia divergens</i>
<i>B. burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa, zirka
d	desoxy
Da	Dalton
dd	didesoxy
DEPC	Diethylcarbonat behandeltes Wasser für Molekularbiologie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
ds DNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
et al.	und andere
FSME	Früh-Sommer-Meningoenzephalitis
fw	vorwärts
G	Guanin
g	Gramm
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
<i>I.</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
IFAT	Immunfluoreszenz-Antikörper-Test
k	Kilo

l	Liter
M	Marker
min	Minute
ml	Milliliter
μ	mikro (10 ⁻⁶)
Osp	Oberflächenprotein („outer surface protein“)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion („Polymerase chain reaction“)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„revolutions per minute“, Umdrehungen pro Minute
rw	rückwärts
rv	„reverse“, rückwärts
Sek.	Sekunden
s.l.	(<i>Borrelia burgdorferi</i>) sensu lato
s.s.	(<i>Borrelia burgdorferi</i>) sensu stricto
SYBR Green	Farbstoff, der Nukleinsäuren bindet
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
Taq	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Zusammenfassung

Die durch Zecken übertragene Lyme-Borreliose ist gegenwärtig eine gehäuft vorkommende Infektionskrankheit mit unterschiedlichem Krankheitsbild und teilweise besonderer Schwere im Krankheitsverlauf. Sie ist in den letzten Jahren zunehmend in den Blickpunkt der Öffentlichkeit geraten. Die Suche nach einem geeigneten prophylaktischen Impfstoff ist ablesbar an der Vielzahl von Veröffentlichungen auf diesem Gebiet. Weitere bedeutende, aber zum Teil seltenere und weniger bekannte durch Zecken übertragene Krankheiten sind neben der Borreliose unter anderem die Babesiose, das Rocky-Mountain-Rückfallfieber, die Früh-Sommer-Meningo-Enzephalitis (FSME), die Anaplaslose, Ehrlichiose, Rickettsiosen und das Q-Fieber. Ziel dieser Arbeit ist es, die beiden Infektionskrankheiten Borreliose und Babesiose näher zu beleuchten. Dabei werden die Infektionsraten von Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken aus dem Zeitgrund/Stadtroda analysiert. Dieses besonders typische Waldrandhabitat stellt eines der größten und beliebtesten Naherholungsgebiete Thüringens dar. Anlaß für die Analyse dieses Gebietes war der erste autochthone Fall einer humanen *Babesia microti*-Infektion in Europa, der aus Thüringen berichtet wurde.

Zur Untersuchung wurden etwa 1000 nüchterne *Ixodes ricinus*-Zecken in den Jahren 2006 und 2007 von März bis Oktober im Zeitgrund/Stadtroda gesammelt. Über die Amplifikation eines Bereichs des *ospA*-Gens der Borrelien und des 18S-rRNA-Gens der Babesien konnten die Prävalenzen beider Erreger, sowie auftretende Koinfektionen ermittelt werden. Dabei ergab sich bei den Zecken für *Borrelia burgdorferi* s.l. eine Infektionsrate von 27,0% (270/1000). Es waren 20,0% (86/430) der Nymphen und 32,3% (184/570) der adulten Zecken infiziert. *Babesia* spp. wurde in 5,0% (50/1000) der *Ixodes ricinus* Zecken nachgewiesen, davon in 1,9% (8/430) der Nymphen und in 7,4% (42/570) der Adulten. Die Infektionsraten in den adulten Zecken waren für beide Erreger signifikant höher als in den untersuchten Nymphen. Mittels RFLP-Analyse mit den Enzymen *Kpn2I*, *BglII*, *SfuI*, *SspI* und *HindIII* und *XbaI* wurden die *B. burgdorferi* sensu lato-Spezies und *OspA*-Typen weiter differenziert.

Zusammenfassung

Dabei konnten die für Europa typischen klinisch relevanten Spezies ermittelt werden, wobei *B. garinii* (133/270) besonders Serotyp 6 (51/270) am häufigsten vertreten war, gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto (70/270), *B. afzelii* (42/270), *B. valaisiana* (28/270) und *B. burgdorferi* s.l. (5/270). Es konnten aber auch die seltenen Spezies *B. lusitaniae* (1/270) und die neu entdeckte *B. spielmanii*-Spezies (3/270) gefunden werden. 1,4% der Zecken traten als Doppelinfektionen mit verschiedenen *B. burgdorferi* s.l.-Subtypen in Erscheinung. Dabei dominierte *B. garinii* in Kombination mit *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* und *B. afzelii*. Eine Zecke war mit *B. afzelii* und *B. valaisiana* infiziert. Die Differenzierung der Babesienpezies erfolgte anhand von Sequenzierungen in die klinisch relevanten Subtypen *B. microti* (28/50) und *B. divergens* (20/50). Zwei Isolate konnten keiner der beiden Spezies eindeutig zugeordnet werden, wurden allerdings mittels der Sequenzierung als *Babesia* spp. bestätigt. Auch Koinfektionen mit den beiden Erregern *Borrelia burgdorferi* s.l. und *Babesia* spp. waren in 1,6% der Zecken (16/1000) bzw. in 5,9% (16/270) der borrelien-infizierten Zecken festzustellen. Eine weibliche Zecke beinhaltete sogar *B. microti*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto.

Mit den entsprechenden Ergebnissen dieser Arbeit wird ein Beitrag zur Epidemiologie der durch Zecken übertragenen Infektionskrankheiten der Borreliose und Babesiose und zur Einschätzung der Infektionsgefährdung in diesem Naherholungsgebiet geleistet. Im Hinblick auf die klinisch große Vielfalt einer Borrelieninfektion und eine mögliche Borreliose-Schutzimpfung sind die Borrelientypisierung und eine daraus resultierende Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten entscheidend. In der serologischen Borrelien-diagnostik können leider nur die bisher als humanpathogen geltenden Borreliensubtypen *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto erfasst werden. Humanpathogenität wird auch für die Spezies *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* vermutet. Es stehen aber noch keine geeigneten serologischen Nachweisverfahren zur Verfügung. Dies ist bei der klinischen Diagnosefindung zu bedenken. Zur Beurteilung der klinischen Relevanz von Babesieninfektionen ist neben dem in dieser Arbeit aufgezeigten Nachweis, der Infektion der Zecken, die Entwicklung diagnostischer Methoden beim Menschen (PCR, Serologie) dringend erforderlich.

2 Einleitung

2.1 *Ixodes ricinus* L.-Zecken

2.1.1 Morphologie

Der Begriff *Ixodes ricinus* Linné wurde erstmalig 1758 vom Botaniker Linné in seinem Werk *Systema naturae* geprägt (Mermod et al. 1973, Liebisch 1991a). *Ixodes ricinus*, besser bekannt als der Gemeine Holzbock, ist die in Europa am häufigsten vertretene Zeckenart mit ca. 90%-igem Anteil an der Gesamtzeckenpopulation und nimmt damit eine besondere Stellung ein (Rufli und Mumcuoglu 1981). Zecken gehören zur Klasse der Spinnentiere (*Arachnida*) und bilden in der Unterklasse *Acari* (Milben/Zecken), Ordnung *Parasitiformes* die drei Überfamilien: *Ixodoideae* (Schildzecken), *Argasidae* (Lederzecken) und *Nuttalliellia* (Rommel et al. 2000).

Der Gemeine Holzbock gehört zur Familie der Schildzecken und hat einen zweigegliederten Körperbau. Dieser beinhaltet das *Gnathosoma* an der Vorderseite, welches die Saugwerkzeuge enthält, sowie den restlichen Körper, der als *Idiosoma* bezeichnet wird. Die Saugwerkzeuge bestehen aus den Kieferklauen (*Cheliceren*), einer mit Widerhaken versehenen Stechborste (*Hypostom*) und den Kiefertastern (*Pedipalpen*) (Rommel et al. 2000). Die Kieferklauen und Kiefertastern sind jeweils paarig angelegt. Zwischen diesen münden die Mund- und Speicheldrüsen. Die Speicheldrüsen beinhalten verschiedene Sekrete, unter anderem Antikoagulantien, Enzyme, lokale Anästhetika und Toxine. Der Körper (*Idiosoma*) ist auf die Aufnahme großer Blutmengen ausgelegt und wird von einer dehnbaren chitinhaltigen Kutikula umhüllt. Der Rücken wird von einem dunkelbraunen bis schwarzen Schild, dem *Scutum* bedeckt. Dieses morphologische Merkmal war für die Namensgebung der Schildzecken verantwortlich und wird aus einer besonders stabilen Chitinhülle gebildet, welche beim Saugakt nicht gedehnt wird. Bei den Männchen bedeckt es den ganzen Hinterleib, bei den Weibchen etwa ein Drittel des braunroten Körpers. Die adulten Schildzecken besitzen vier, die Larven drei

Beinpaare. Ein weiteres, wichtiges Baubestandteil ist das Hallersche Organ. Dieses Sinnesorgan befindet sich im untersten Segment des vordersten Beinpaars und ist eine Anhäufung spezifischer Chemorezeptoren. Es dient dazu, vom Wirt abgegebene Substanzen wie z.B. Ammoniak, Buttersäure und CO₂ zu detektieren. Die Zecke ist damit wahrscheinlich in der Lage, auch über weite Entfernungen (ca. 10-15 m) mögliche Wirte wahrzunehmen (Leonovich 2004).

2.1.2 Entwicklungszyklus, Wirtsbefall

Die Schildzecke durchläuft im Rahmen ihrer Entwicklung drei Stadien: als Larve, Nymphe und adulte Zecke. In jedem dieser Stadien ist eine Blutmahlzeit zur Weiterentwicklung notwendig (Süss und Zenk 1993). Die *Ixodoideae* weisen im Vergleich zu anderen Zeckenarten (z.B. *Ornithodoros*-Arten) einen beschleunigten Entwicklungszyklus auf, in dem nur ein Nymphenstadium auftritt. Die Abbildung (Abb. 2.1.1) stellt die Stufen des Entwicklungszyklus schematisch dar. In jedem dieser Entwicklungsstadien ist ein Wirt unabdingbar. Als Wirte fungieren z.B. Vögel, Reptilien, kleine Säugetiere, Haus- und Wildtiere. Der Entwicklungszyklus beginnt mit der Eiablage der Weibchen. Die Anzahl der Eier pro Weibchen beträgt ca. 3000 (Kahl 1994). Der Gemeine Holzbock durchlebt das erste Entwicklungsstadium als Larve und ist ca. 0,6 mm groß. Zur Umwandlung in das Nymphenstadium sucht sich die Larve einen Wirt, der ungefähr so groß ist wie eine Maus und saugt 4-5 Tage an diesem. Nach anschließendem Ruhestadium häuten sich die Larven zu Nymphen. Diese ca. 1 mm großen Parasiten bevorzugen zur Blutmahlzeit etwas größere Säugetiere wie z.B. Hasen, Kaninchen, Füchse und auch Menschen. Die Nymphen saugen 3 bis 5 Tage und durchlaufen danach einen mehrwöchigen Reifungsprozess zur geschlechtsreifen, adulten Zecke. Die adulten Männchen haben eine Größe von etwa 2,5 mm und die Weibchen eine Größe von ca. 2,4 bis 4,8 mm erreicht. Adulte Zecken präferieren große Säugetiere als Wirte wie z.B. Rotwild, Dachse und auch den Menschen (Rufli und Mumcuoglu 1981). Das Blutsaugen kann in diesem Fall deutlich länger dauern. Noch während der Blutmahlzeit suchen die Männchen den dazugehörigen Partner auf dem Wirt und paaren sich mit ihm. Das Männchen stirbt kurz nach der Paarung, das Weibchen erst nach der Eiablage. Nach dem Schlüpfen der Eier wiederholt sich der gesamte

Einleitung

Entwicklungszyklus. Das Durchlaufen des Zyklus beträgt durchschnittlich 3 Jahre, kann jedoch abhängig von verschiedenen Faktoren (Witterungsbedingungen, Wirtsverfügbarkeit) stark variieren. Es sind lange Ruhephasen (bis zu 3 Jahren) zwischen den Blutaufnahmen möglich, um schlechte Umwelt- und Witterungsbedingungen (Überwinterung, Trockenheit in den Sommermonaten) zu überdauern. Der Entwicklungszyklus korreliert eng mit der saisonalen Aktivitätsdynamik der Zecke und den zugrunde liegenden Umweltfaktoren.

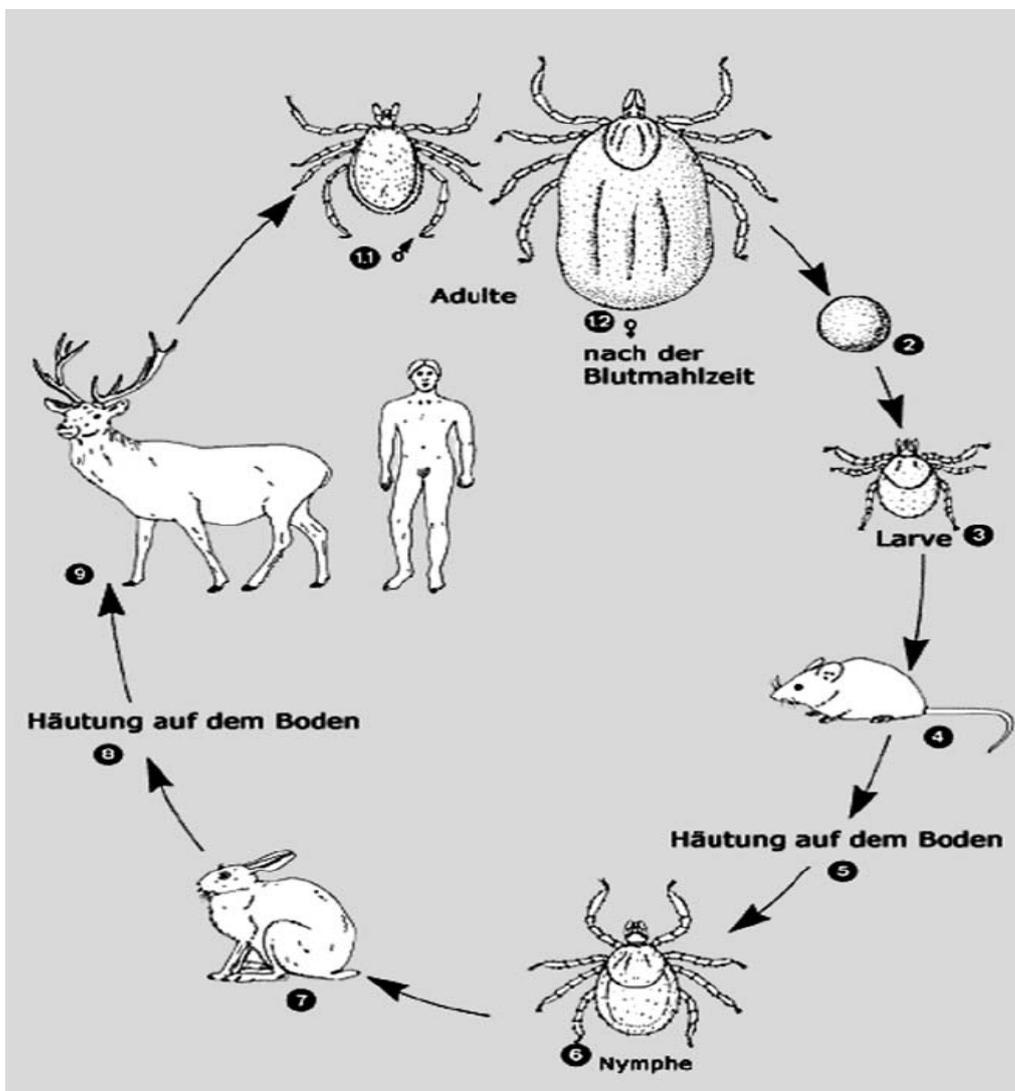


Abb. 2.1.1 Entwicklungszyklus *Ixodes ricinus*

In der Abbildung nach Hellenbrand und Poggensee (Hellenbrand und Poggensee 2007) sind die einzelnen Zeckenentwicklungsstadien mit ihren spezifischen Wirten erkennbar.

2.1.3 Aktivität und Biotop

Die Zeckenaktivität ist vor allem von klimatischen Faktoren abhängig. Als Optimum fungieren Temperaturen zwischen 17°C und 20°C und relative Luftfechtigkeiten von 80-95% (Rommel et al. 2000). In Mitteleuropa wird die Jahresaktivität in *Ixodes ricinus*-Zecken häufig als bimodal angegeben, mit einem Maximum im Frühjahr und einem zweiten Häufigkeitsgipfel im Herbst (Nilsson 1988, Kubiak et al. 2004). Bei günstigeren Umweltbedingungen werden auch unimodale Verläufe beschrieben (Kurtenbach et al. 1995). Die Hauptaktivität besteht von März bis Oktober. Dabei ist an besonders heißen Tagen die Aktivität am frühen Vormittag und in den Abendstunden am größten (Kahl 1994). Bei Temperaturen über 10°C lässt sich gelegentlich auch eine ganzjährige Aktivität beobachten (Pretzmann et al. 1964). Zecken benötigen Gebiete, an denen humides Klima und eine hohe Luftfeuchtigkeit herrschen (Stanek und Hofmann 1994). Ein geeignetes Biotop bieten Nadel-, Laub- und Mischwaldbestände mit viel Unterholz, dichten Krautzone, Waldlichtungen und weitläufigen Bach- und Flussauen. Zecken bevorzugen entsprechend ihrer Entwicklungsstadien unterschiedliche Nischen in diesem Biotop, was auf die unterschiedliche Größe ihrer entsprechenden Hauptwirte (z.B. Mäuse, Igel, Füchse, Rotwild) zurückzuführen ist. „So finden sich Larvenstadien meist an Grasspitzen nicht höher als 20 cm, Nymphen an Pflanzen bis zu einer Höhe von 1 m und Adultstadien nicht höher als 1,50 m und dies bevorzugt an Wildwechsellern, Wegen und anderen Übergangszonen“ (Süss und Schrader 2004a). Larven und Nymphen sind auch häufig in der Laubstreu zu finden. Zecken befinden sich entgegen der weit verbreiteten Meinung in keinem ihrer Entwicklungsstadien auf Bäumen.

2.1.4 Saugakt, übertragbare Erreger

Die Zecke erkennt anhand bestimmter Signale, wie z.B. Buttersäure im Schweiß oder ausgeatmeten CO₂ ihren Wirt. Auch ein alleiniger mechanischer Reiz ist ausreichend, um den nächsten Wirt ausfindig zu machen. Ein nur wenige Sekunden dauernder Kontakt genügt für das Festhalten am Wirt (Liebisch 1991b). Die Suche nach einer geeigneten Einstichstelle kann bis zu mehrere Stunden dauern. Bevorzugte Orte zum Blut saugen sind feuchte, warme und gut durchblutete Körperstellen (Süss und Schrader 2004a).

Einleitung

Beim Menschen entsprechen solche Bereiche v.a. dünne Hautpartien, die behaarte Kopfhaut, Ohren, Hals, Arm- und Kniebeugen, Leistregion, sowie Hände und Füße (Süss und Schrader 2004a). Die Zecke ritzt die Haut des Wirtes mit ihren Mundwerkzeugen, den *Cheliceren* auf. Dann führt sie diese gemeinsam mit dem *Hypostom* in die Stichwunde ein. Zur Verankerung dienen der Zecke kleine Widerhaken am *Hypostom* und die Abgabe einer schnell härtenden Substanz beim Saugvorgang. Aus diesem Grund ist die Entfernung nach längerem Saugakt schwieriger. Die Zecke zementiert sich regelrecht in die Wundhöhle ein. Der Stechakt dauert circa 15 Minuten und bleibt vom Wirt meist unbemerkt durch schmerzstillende Substanzen im Speichel der Zecke (Rufli und Mumcuoglu 1981). Weiterhin im Speichel enthalten sind gewebssauflösende Flüssigkeiten, mit Hilfe derer sich die Zecke eine Wundgrube schafft. Aus dieser saugt sie Blut, Gewebsflüssigkeit (Lymphe) und zersetzte Gewebsbestandteile. Sind darin Mikroorganismen enthalten, werden diese hierbei ebenfalls von der Zecke aufgenommen und können beim nächsten Saugakt an einen nachfolgenden Wirt weitergegeben werden (Lebisch 1991a). Die Wahrscheinlichkeit für eine Übertragung von Erregern auf den Wirt steigt mit der Dauer des Saugaktes (Robert-Koch-Institut 2007a). Die *Ixodes ricinus* Zecke ist somit ein Vektor für human- und veterinärmedizinisch relevante Erreger wie z.B. das Zeckenzephalitis-Virus (FSMEV), Borrelien, Babesien und Anaplasmen (Rommel et al. 2000).

Zu den wichtigsten durch Zecken übertragbaren Krankheitserregern gehören nach (Süss und Zenk 1993):

- Bakterien: Borrelien, Rickettsien, Anaplasmen, Ehrlichien, Coxiellen, Francisellen, Brucellen, Leptospiren, Salmonellen
- Viren: Frühsommermeningoencephalitis-Virus (FSME), Russian-spring-summer-encephalitis-Virus (RSSE)
- Parasiten: Babesien

Als bedeutendste Vektoren für diese humanpathogenen Krankheitserreger fungieren in Deutschland die *Ixodes ricinus* Zecken. Auch der nach Deutschland importierten Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*), die etwas größer und bunter ist und sich aktiv auf ihre Wirte zu bewegt, wird eine immer

größer werdende medizinische Bedeutung zugesprochen (Robert-Koch-Institut 2007b). In anderen Ländern sind andere Zeckenarten bedeutender so z.B. einige *Dermacentor*-Arten, die für die Übertragung des Fleckfiebers (Rocky Mountain spotted fever) verantwortlich gemacht werden. Mit einer Blutmahlzeit nehmen die *Ixodes ricinus* Larven das 10 bis 20-fache, Nymphen das 15 bis 40-fache, adulte Männchen das 2-fache und adulte Weibchen das 100 bis 200-fache ihres Körpergewichtes an flüssiger Nahrung auf (Rufli und Mumcuoglu 1981, Radda et al. 1986, Liebisch 1991a, Kahl 1994, Stanek und Hofmann 1994). Diese enorme Größenzunahme ist durch Wachstums- und Dehnungsvorgänge an Kutikula und Mitteldarmepithel möglich. Durch erhöhte Sekretionstätigkeit der Speicheldrüsen kann die Zecke die Aufnahme dieser großen Menge an Nahrung, die im Vergleich zur Zeckenlymphe hyposmolar ist, ausgleichen (Rommel et al. 2000). Daneben werden Teile der aufgenommenen Nahrung durch gelegentliche Regurgitation aus dem Darm der Zecke zurück in das Wirtsgewebe injiziert (Eckert et al. 2005). Durch diese Form der Nahrungseindickung, kann die Zecke die Blutaufnahme vom Wirt maximal optimieren.

2.1.5 Prophylaxe

Einen sicheren Schutz vor Zecken gibt es nicht. Die beste Prophylaxe ist ein Meiden der Zeckenbiotope wie z.B. hohes Gras, eine dichte Krautzone und Unterholz (Robert-Koch-Institut 2008). Nach einem Aufenthalt in einem solchen Biotop ist es unumgänglich, den gesamten Körper auf Zecken abzusuchen, insbesondere auch versteckte Hautstellen wie z.B. hinter den Ohren, das Kopfhaar oder Hautfalten (Wilske und Fingerle 2000). Es wird ausserdem das Tragen von möglichst geschlossener, heller Kleidung empfohlen. Das Verwenden von Insekten-abweisenden Mitteln oder Repellents wie z.B. Autan zeigt nur für circa zwei Stunden eine begrenzte Wirkung (Robert-Koch-Institut 2008). Bei wenigen Krankheitserregern, wie FSME in der Humanmedizin oder Borrelien in der Veterinärmedizin besteht die Möglichkeit einer Impfung. Für besonders gefährdete Berufsgruppen wie z.B. Soldaten gibt es Spezialkleidung zum Schutz vor stechenden Insekten (Faulde und Uedelhoven 2006). Faulde und Uedelhoven entwickelten neue Imprägnationsmethoden für diese Schutzkleidung, damit diese auch unter Alltagsbedingungen und nach

mehreren Waschgängen wirksam ist. Dazu wurde eine neue Polymerschicht mit dem Insektizid Permethrin imprägniert (Faulde und Uedelhoven 2006).

2.1.6 Zeckentfernung

Es gibt verschiedene Methoden zur fachgerechten Entfernung einer Zecke. Laut AWMF Leitlinie 2005 (AWMF 2005) wird folgende Vorgehensweise empfohlen: Die festgesaugte Zecke soll so schnell wie möglich mit einer Pinzette, Zeckenkarte, Zeckenzange oder einem Skalpell entfernt werden. Die Zecke soll vorsichtig nach hinten herausgezogen werden, ohne den Zeckenleib dabei zu drehen oder zu quetschen (Robert-Koch-Institut 2008). Auf die Anwendung von aggressiven Substanzen wie z.B. Öl, Alkohol oder Nagellack sollte verzichtet werden (Süss und Schrader 2004a). Hände und Einstichstelle sind nach der Entfernung zu desinfizieren. Kommt es dennoch zu einer Entzündung im Bereich der Einstichstelle, ist ein Arzt aufzusuchen. Die gestochene Person muss in diesem Fall über mögliche wichtige Manifestationen einer Infektionskrankheit aufgeklärt werden, wie z.B. die sogenannte „Wanderröte“ (*Erythema migrans*) bei einer Borrelioseinfektion oder über allgemeine grippeartige Symptome bei anderen weniger bekannten Erregern, wie Rickettsien oder Anaplasmen (AWMF 2005).

***Borrelia burgdorferi* sensu lato**

2.2.1 Definition, Geschichte, Klassifizierung

Definition Borrelien:

Borrelien sind eine Gattung großer, beweglicher, schraubenförmiger Bakterien der Spirochäten-Familie mit 3-10 helixartigen Windungen. Benannt wurden sie nach Amédée Borrel, einem bekannten Bakteriologen aus Straßburg (1867–1937). Die Lyme-Spirochäten *Borrelia burgdorferi* sensu lato wurden erstmals von Willy Burgdorfer im Jahre 1982 in Schildzecken beschrieben (Burgdorfer et al. 1982, Burgdorfer 1986) und von Johnson et al. seinem Entdecker zu Ehren benannt (Johnson et al. 1984). Diese Bakterien sind Überträger der Lyme-Borreliose. Benannt wurde diese Erkrankung nach dem Ort Lyme im US-Staat

Einleitung

Connecticut, in dem die Krankheit 1975 zum ersten Mal bei Kindern gehäuft beobachtet wurde und in Zusammenhang mit einem Zeckenstich gebracht werden konnte (Steere et al. 1977). Zum *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bbsl)-Komplex rechnet man mittlerweile 11 Spezies:

- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Baranton et al. 1992)
- *Borrelia garinii* (Baranton et al. 1992)
- *Borrelia afzelii* (Baranton et al. 1992)
- *Borrelia valaisiana* (Wang et al. 1997)
- *Borrelia lusitaniae* (Fleche et al. 1997)
- *Borrelia japonica* (Kawabata et al. 1993)
- *Borrelia andersonii* (Marconi et al. 1995)
- *Borrelia tanukii* (Fukunaga et al. 1996)
- *Borrelia turdi* (Fukunaga et al. 1996)
- *Borrelia bissettii* (Postic et al. 1998)
- *Borrelia spielmanii*/A14S (Fingerle et al. 2008)

Von diesen Spezies konnten bisher vier als humanpathogen nachgewiesen werden: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii* (Süss und Schrader 2004a) sowie *B. spielmanii* (A14 S) (Fingerle et al. 2008). Für *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* wird Humanpathogenität nur vermutet. Alle sechs Spezies sind in Europa vertreten. In den USA hingegen gehören alle humanpathogenen Stämme ausschließlich der Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto an (Robert-Koch-Institut 2007a).

2.2.2 Morphologie

Die spiralförmigen Borrelien umfassen eine Länge von 20 µm und 0,3 µm Dicke (Wilske 1993/1994). Die unter der äußeren unstrukturierten, mukoiden Hülle liegenden Endflagellen ermöglichen die schraubenartige Fortbewegung (Barbour und Hayes 1986). Das Genom von *B. burgdorferi* sensu lato besteht im Gegensatz zu anderen Bakterien aus einem linearen Chromosom und mehreren zirkulären Plasmiden (Fraser et al. 1997). Auf den Plasmiden werden Erbinformationen für wichtige Oberflächenproteine wie z. B. das Outer surface protein A (OspA), das Outer surface protein B (OspB) und

das Outer surface protein C (OspC) kodiert (Fingerle et al. 1995, Fingerle et al. 2000, Schwan 2003). Diese sind in ihrer immunologischen und genetischen Expression sehr variabel, sowohl während der in vitro Kultivierung als auch bei der Übertragung auf einen Wirt (Fingerle et al. 1995). Diese Vielfalt der Oberflächenproteine begründet sich u. a. in der ausgeprägten Gruppenheterogenität des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes.

2.2.3 Übertragung, Pathogenität

Übertragung:

Die Übertragung von *B. burgdorferi* sensu lato erfolgt überwiegend durch Schildzecken, sehr selten auch durch Stechmücken oder Pferdebremsen (AWMF 2005). Die Erreger sind im Mitteldarm dieser Arthropoden zu finden. Die Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung nimmt mit der Dauer des Saugaktes zu (Kahl 1994). Eine transovarielle Übertragung auf die aus einem Weibchen gezeugte Zeckenpopulation ist möglich (Wilske 1993/1994). Auch eine Übertragung von Mensch zu Mensch durch Bluttransfusion ist denkbar (Schmidt et al. 1985).

Pathogenität:

Borrelia burgdorferi benötigt „Outer surface protein C“, um an Wirtszellen zu adhären und Zellverbände zu durchdringen. Während OspA und OspB gewöhnlich auf der Oberfläche lokalisiert sind, wird OspC wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Blutmahlzeit exprimiert (Wilske et al. 1996). Kommt es zur Infektion mit Borrelien, werden von der Wirtszelle verschiedene Zytokine produziert.

2.2.4 Epidemiologie (Prävalenzen)

Während in den USA die Zeckenspezies *Ixodes scapularis* als häufigster Überträger von *Borrelia burgdorferi* s.l. fungiert, ist es in Mitteleuropa *Ixodes ricinus*. In Europa liegen die durchschnittlichen Infektionsraten bei 10 bis 20%, wobei saisonale und regionale Unterschiede zu beobachten sind. Auch in den einzelnen Entwicklungsstadien lassen sich unterschiedliche Prävalenzen ermitteln.

2.2.5 Borreliose: Klinisches Bild, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe

Die Infektionskrankheit Lyme-Borreliose durch *Borrelia burgdorferi* verursacht, wird in drei klinische Stadien eingeteilt.

Klinisches Bild:

- Stadium I:

Dieses Stadium ist durch das Auftreten einer ringförmigen Rötung, dem Erythema migrans um die Einstichstelle herum gekennzeichnet, welches allerdings auch bei bis zu 50% der Bevölkerung fehlen kann. Diese sogenannte „Wanderröte“, erstmals beschrieben durch Afzelius (Afzelius 1910), breitet sich auf der Haut zunehmend aus, während es im Zentrum bereits zur Abblässung kommt. Multiple Erythema migrans-Fälle werden häufig von Nymphen verursacht. Dieses Zeckenstadium wird jedoch oft aufgrund ihrer Größe vom Patienten übersehen. Allgemeinsymptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, sowie Lymphknotenschwellungen können auftreten. Gelegentlich wird auch ein rötlich livider Tumor (Lymphozytom) beobachtet. Dieses findet sich typischerweise an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum (Süss und Schrader 2004a). Es kann jedoch oftmals nicht eindeutig einem Stadium zugeordnet werden.

- Stadium II:

Noch nach Wochen bis Monaten kann es nach einem unbehandelten Frühstadium zu Manifestationen und Späterscheinungen kommen. Häufigste Manifestationsform dabei ist die Neuroborreliose. Über Blut- und Lymphwege kommt es zur Erregerausbreitung in die verschiedenen Organe. Folglich können Lähmungserscheinungen, Gehirn, Herzmuskel- und Hirnhautentzündungen auftreten. Bei Befall des Herzmuskels kann es zu Herzrhythmusstörungen mit Sinustachykardien und AV-Blockbildung kommen. Als Leitsymptome der Neuroborreliose treten starke radikuläre Schmerzen, Lähmung des 7. Hirnnervs (Fazialisparese) und lymphozytäre Pleozytose mit Eiweißvermehrung im Liquor auf (Süss und Schrader 2004a). Auch Gelenk- und Hautmanifestationen sind in diesem Stadium möglich, die sich als Arthritiden und Akrodermatitis cutis benigna äußern können.

Einleitung

- Stadium III:

Bei einem Übergang in dieses Stadium erfolgt die Chronifizierung und Erregerpersistenz. Es können lange beschwerdefreie Intervalle (Latenzzeiten) auftreten. Die häufigsten Manifestationen des Stadiums III sind die Lyme-Arthritis mit Befall der Gelenke und die Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer (ACA) (Süss und Schrader 2004a). Die ACA imponiert als ein zigarettenpapierdünnes, gefaltetes Aussehen der Haut mit livider Verfärbung und Hervortreten der Gefäße. Auch chronische Erkrankungen der Sinnesorgane sind möglich. Erkennbar wird dieses Stadium an Symptomen wie z.B. Schwindel, Gedächtnis-, Konzentrations- und Verhaltensstörungen. Sehr selten tritt die chronische Borrelien-Enzephalomyelitis auf, welche überwiegend das ZNS befällt und mit Lähmungserscheinungen der Extremitäten (Para- oder Tetraparesen) einhergehen kann (Süss und Schrader 2004a).

Anhand umfangreicher Untersuchungen von Patientenmaterialien (wie z.B. Hautbiopate, Liquor und Serum) zeigt sich, dass bestimmte klinische Erscheinungen wahrscheinlich bevorzugt von einer Borrelienspezies verursacht werden. Durch *B. afzelii* werden überwiegend Hautmanifestationen hervorgerufen, besonders die ACA, *B. burgdorferi* sensu stricto verursacht häufig vorwiegend arthritische Gelenkbeschwerden, während die mit Neuroborreliose assoziierten Stämme deutlich heterogener sind (Postic et al. 1998). Meist überwiegt hier jedoch *B. garinii* (Robert-Koch-Institut 2007a). Dazu gibt es derzeit allerdings widersprüchliche Diskussionen, da bei dieser Aussage nur die 3 Spezies *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto mit berücksichtigt wurden. Die anderen Spezies wie z.B. *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* wurden zum Zeitpunkt dieser Studien noch nicht mit erfasst. Das Erythema migrans kann durch alle Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes gleichermaßen hervorgerufen werden.

Diagnostik:

Die Diagnostik erfolgt primär anhand des klinischen Bildes. Wegweisend dabei ist das Erythema migrans, welches bei der Erkrankung allerdings auch fehlen kann (Süss und Schrader 2004b). Labordiagnostisch sollte ein Antikörpersuchtest im Serum oder bei Verdacht auf eine Neuroborreliose in einem

Einleitung

IgG-/Serumpaare erfolgen. Im Rahmen einer Stufendiagnostik wird zuerst der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) oder der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay-Test (ELISA) verwendet. Kommt es bei diesen Verfahren zum Nachweis von Antikörpern, erfolgt die zweite Stufe der Diagnostik, der Immunoblot (Robert-Koch-Institut 2007a). Ein positiver Antikörperbefund spricht allerdings nur in Zusammenhang mit entsprechenden klinischen Befunden für eine Lyme-Borreliose, da es im Rahmen anderer Infektionskrankheiten zu falsch-positiven Ergebnissen, sowie zu falscher Interpretation von Durchseuchungstieren kommen kann (Süss und Schrader 2004a, Robert-Koch-Institut 2007a). Ein Antikörpernachweis gelingt erst nach ein bis drei Wochen. Im Stadium I fehlen die Antikörper bei 50 bis 80% der Patienten (Süss und Schrader 2004a). Patienten mit Neuroborreliose im Stadium II sind in 70 bis 90% der Fälle seropositiv und Patienten mit Spätmanifestationen in nahezu allen Fällen (Süss und Schrader 2004a). Ein direkter Erregernachweis sollte nur bei diagnostisch unklaren Fällen durchgeführt werden und nicht zu Therapieempfehlungen führen (Robert-Koch-Institut 2007a). Dazu eignen sich IgG, Gelenkpunktate und Biopsiematerialien. Der Nachweis von Borrelien in Zecken kann mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) über Amplifizierung eines Abschnittes des 'fla' oder 'ospA'-Gens oder der Dunkelfeldmikroskopie erfolgen.

Therapie/Prophylaxe:

Jede Manifestationsform der Lyme-Borreliose sollte antibiotisch therapiert werden, wobei Penizilline, Tetrazykline und Cephalosporine zum Einsatz kommen (AWMF-Leitlinie 2005). Der frühzeitige Therapiebeginn ist hier bedeutend. Das Erythema migrans sollte zu einer 14-tägigen oralen Doxzyklin-Therapie, die Lyme-Arthritis zu einer 4-wöchigen oralen Doxzyklin-Therapie und Spätmanifestationen wie z.B. die Neuroborreliose zu einer intravenösen Therapie mit Cephalosporinen veranlassen (Süss und Schrader 2004a, Robert-Koch-Institut 2007a). Die wirksamste Prophylaxe ist der Schutz vor Zeckenstichen, ein frühzeitiges Entfernen der saugenden Zecke, sowie die Früherkennung als auch die rechtzeitige Therapie mit Antibiotika um Spätfolgen zu vermeiden (Süss und Schrader 2004a). Ein wirksamer Impfstoff ist in Europa aufgrund der großen Speziesheterogenität (mindestens 7 verschiedene SpA-Serotypen) noch nicht verfügbar (Robert-Koch-Institut 2007a).

2.3 Babesia spp.: B. microti und B. divergens

2.3.1 Definition, Geschichte, Klassifizierung

Definition Babesien:

Babesien sind birnenförmige, parasitäre Protozoen bzw. plasmodienähnliche Hämoparasiten, die bei Wirbeltieren in den Erythrozyten vorkommen. Sie wurden 1888 vom rumänischen Wissenschaftler Victor Babès (Babes 1888) entdeckt.

Etwa 100 verschiedene *Babesia*-Spezies sind mittlerweile bekannt (Hunfeld et al. 2002, Hunfeld et al. 2008). Zwei Spezies sind als humanpathogene Erreger besonders hervorzuheben, *Babesia divergens*, vorwiegend in Europa, und *Babesia microti*, vorwiegend in Nord-Amerika vorkommend (Hunfeld et al. 2002). Allerdings gewinnen noch bisher unbekannt Spezies durch aktuelle Fallberichte von humaner Babesiose als Krankheitserreger für den Menschen an Bedeutung (Herwaldt et al. 2004, Conrad et al. 2006, Haeselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2008). Es gibt in Europa inzwischen drei bekannt gewordene Fälle von humaner Babesiose durch *Babesia divergens* EU1, einem Erreger der zu den *Babesia divergens*-like Organismen gerechnet wird (Herwaldt et al. 2004, Haeselbarth et al. 2007). *Babesia divergens* wurde erstmals von M'Fadyean und Stockmann 1911 beschrieben, *Babesia microti* von Franca im Jahre 1912 nachgewiesen und aus einer Fledermaus isoliert. In der Veterinärmedizin ist die Babesiose schon lange von enormer Bedeutung und besser bekannt unter den Begriffen „Hundemalaria“ durch *Babesia canis* beim Hund oder als „Weiderot“ beim Rind. Bei Rindern kommen mehrere Babesienarten vor (*B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. major*, *B. ovata*, *B. jakimovi*). Seit 1957 werden auch klinische Infektionen beim Menschen gemeldet (Kjemtrup und Conrad 2000). In Europa sind mittlerweile ca. 39 Fälle humaner Babesiose populär geworden (Hildebrandt et al. 2008). Besonders Patienten nach Entfernung der Milz (Splenektomie) bzw. im Zustand einer Immunsuppression sind dabei betroffen.

Klassifizierung:

Die verschiedenen Babesienarten gehören zu der Gattung *Babesia*. Sie werden in der Familie *Babesiidae* zusammengefasst und zählen zur Ordnung der *Piroplasmida* (Kjemtrup und Conrad 2000).

2.3.2 Morphologie

Babesien werden in kleine und große Arten unterteilt anhand der Größe ihrer einzelligen Merozoiten, die zentral im Erythrozyten als Form eines Malteserkreuzes vorliegen (Rommel et al. 2000). Je nach Entwicklungsstadium sind diese amöboid, ring-, tropfen- oder birnenförmig und charakteristisch als Rund- und Zwillingsformen in Erythrozyten angeordnet. *Babesia divergens* (1,7 x 2 µm) und *B. microti* (1-3 µm Länge) gehören morphologisch zu den kleinen Babesienarten (Eckert et al. 2005). Allerdings können sie in Abhängigkeit vom Wirt in Größe und intraerythrozytären Lage variieren.

Entwicklungszyklus:

Kennzeichnend für diese Parasiten ist der heterogene Lebenszyklus, d.h. der regelmäßige Wechsel zwischen geschlechtlicher und ungeschlechtlicher Fortpflanzung. In den Erythrozyten des Wirbeltieres erfolgt die ungeschlechtliche Vermehrungsphase die Merogonie. In der Zecke hingegen findet die geschlechtliche Vermehrung die Gamogonie, mit anschließenden mehreren ungeschlechtlichen Teilungen (Sporogonien) statt (Kakoma und Mehlhorn 1994). Die Zecke stellt damit definitionsgemäß den Endwirt für Babesien dar, das Rind den Zwischenwirt. Die Sporozoiten werden durch den Speichel der Zecke auf die Wirbeltiere übertragen und entwickeln sich in den Erythrozyten zu Trophozoiten und durch anschließende Teilungen zu Merozoiten. Wenn Zecken an infizierten Wirten saugen, nehmen sie diese Erregerstadien gemeinsam mit den Erythrozyten auf und setzen sie im Mitteldarm frei. Dann teilen sie sich zu Gameten und verschmelzen zur Zygote. Über die Hämolymphe gelangen die Erreger in alle Organe der Zecke, so auch in die Eierstöcke (transovariable Infektion) und Speicheldrüsen. Dort entwickeln sie sich zu Sporozoiten weiter, so dass sie beim nächsten Saugakt zu erneuten Infektionen führen können (Homer et al. 2000).

2.3.3 Übertragung

Als Vektoren für den Menschen relevanter Babesienarten dienen vornehmlich die Zeckenarten *Ixodes ricinus* in Europa und *Ixodes scapularis* in Nordamerika. Für die Übertragung bei Tieren sind zudem die Gattungen *Dermacentor*, *Boophilus* und *Rhipicephalus* von Bedeutung (Süss und Schrader 2004a).

2.3.4 Epidemiologie (Prävalenzen)

Epidemiologische Daten zur Babesienprävalenz stehen im Gegensatz zu den umfangreichen Borrelien-Untersuchungen kaum zur Verfügung. Von Hunfeld und Hartelt (Hunfeld et al. 2002, Hartelt et al. 2004) konnte erstmals eine Babesienprävalenz in Zecken von ca. 1% aus zwei verschiedenen Regionen Deutschlands ermittelt werden.

2.3.5 Humane Babesiose: Klinik, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe

Die Babesiose ist eine malariaähnliche Infektionserkrankung, verursacht durch die intrazellulären Hämoparasiten der Familie *Babesiidae* (Stanek 2005). Nach neuester Literatur und entsprechenden Fallberichten werden neben *B. microti*- und *B. divergens*-Infektionen auch noch andere Babesienpezies als Erreger vermutet (Herwaldt et al. 2004, Haeselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2008). Die Infektionskrankheit gehört zum Komplex der durch Zecken übertragenen Krankheiten.

Klinik:

Das klinische Erscheinungsbild ist stark von der auftretenden Zersetzung der Erythrozyten (Hämolyse) geprägt und erstreckt sich von influenzaähnlichen Verläufen bis hin zu bedrohlichen Krankheitszuständen mit tödlichem Ausgang. Als Symptome treten Übelkeit, Appetitlosigkeit, Müdigkeit sowie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschwäche und Arthralgien auf (Stanek 2005). In seltenen Fällen kommt es zu fulminanten malariaähnlichen Verläufen mit Schweißausbrüchen, Schüttelfrost, Temperaturen über 40°C bis hin zur hämolytischen Anämie mit Hämoglobinurie, Ikterus, Hepato-Splenomegalie, Nieren- und akutem Lungenversagen (Süss et al. 2004). Auch inapparente Verläufe sind möglich. Da die Erreger Monate bis Jahre im Blut persistieren können, besteht die Gefahr der Übertragung durch Bluttransfusionen (Hunfeld et al. 2002). Komplikationen treten vermehrt bei splenektomierten, immunsupprimierten Patienten auf und enden meist letal. Diese Patienten weisen hauptsächlich Infektionen mit *Babesia divergens* auf (Stowell et al. 2007). *Babesia microti*-Infektionen hingegen, kommen vorwiegend in Nord-Amerika vor und scheinen weniger bedrohlich zu verlaufen (Süss et al. 2004). Allerdings wurde 2007 der erste autochthone Fall einer humanen *Babesia microti*-Infektion aus Europa beschrieben (Hildebrandt et al. 2007).

Einleitung

Für viele klinische und subklinische Verläufe wird auch ein Zusammenhang mit Koinfektionen wie z.B. mit Borrelien oder Anaplasmen vermutet (Gorenflot et al. 1998).

Diagnostik:

Die Diagnostik der Babesiose erfolgt mittels direkter Mikroskopie eines Giemsa-gefärbten Blutausstrichs. Dabei sind die Babesien als pleomorphe, ringförmige Strukturen zu erkennen und ähneln plasmoiden Malariaerregern (Stanek 2005). Es kommt zur intraerythrozytären Tetradenbildung, den sogenannten Malteserkreuzen (Süss et al. 2004). Im Gegensatz zu Plasmodien ist kein Malariapigment vorhanden, dies kann allerdings auch in frühen Plasmodienstadien fehlen. Serologische Tests können bei Infektionen durch bisher nicht bekannte Erregerspezies oder bei immunsupprimierten Patienten negativ ausfallen, da diese kaum Antikörper bilden können. Gerade hier ist die exakte Diagnosestellung besonders wichtig, da bei diesen Patienten die Infektionen oft sehr schwer oder auch letal verlaufen. Sensitiver lässt sich die Infektion mit molekulargenetischen Methoden (z.B. mittels PCR) erkennen. Mit der Amplifikation eines spezifischen Abschnitts des 18S-rRNA-Gens und anschließender Nukleinsäuresequenzanalyse lassen sich Babesienspezies im Stadium einer bestehenden Parasitämie erfassen (Süss et al. 2004).

Therapie/Prophylaxe:

Empfohlen wird eine Arzneimittelkombinationen: Chinin/Clindamycin über 7-8 Tage oder Atovaquon/Azithromycin. Bei schweren Hämolysen und drohendem Nierenversagen können Austauschtransfusionen notwendig werden (AWMF 2005). Als allgemeine Prophylaxe sind die Verhinderung von Zeckenstichen und die Zeckenentfernung innerhalb von 48 Stunden zu empfehlen. Dies kann eine Infektion vermeiden, da die infektiösen Sporoziten erst während der Blutmahlzeit reifen (Hunfeld et al. 2008). Da die Übertragung auch durch Blutspender möglich ist, wäre zukünftig ein Screening der Spender wünschenswert.

3 Zielsetzung der Arbeit

Der Kenntnisstand in der Epidemiologie zeckenübertragbarer Krankheiten wie z.B. der Lyme-Borreliose, Früh-Sommer-Meningoencephalitis (FSME) und Babesiose wurde seit Entdeckung der Erreger ständig umfassender. Es stellt sich die Frage, wie dieser anhand der Untersuchungen in der Region Thüringen/Zeitgrund bereichert werden kann. Für die vorliegenden Prävalenz-Untersuchungen wurde der Zeitgrund stellvertretend für Mittelthüringen gewählt. Das Naherholungsgebiet bei Stadtroda erfüllt die Kriterien eines ausreichenden Vorkommens von *Ixodes ricinus* Zecken und einer starken Besucherfrequenz. Thüringen ist bereits ein bekanntes Endemiegebiet für Borreliose; und auch der auftretende FSME-Fall eines 59-jährigen Sportlers nach einem Zeckenstich lenkte die Aufmerksamkeit auf diese Region (Kollmeier et al. 2002). Kurze Zeit später folgte eine Fallbeschreibung der ersten autochthonen Babesien-Infektion Europas aus Thüringen (Hildebrandt et al. 2007). *Ixodes ricinus* Zecken stellen bedeutende Vektoren für verschiedenste Infektionskrankheiten in Europa dar. Dies war Anlass, die Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Babesia* spp. in dieser Region Thüringens näher zu analysieren.

Bevor Routineverfahren zur Erreger-Detektion eingeführt werden, ist es sinnvoll, das Vorkommen dieser Erreger in ihrem Hauptvektor, der Zecke aufzuzeigen. Bei der Untersuchung der Zecken auf Borrelien ist auch die Aufschlüsselung der Prävalenz der einzelnen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Subtypen von Bedeutung. Jede Spezies und jeder OspA-Serotyp scheint bevorzugt bestimmte Organmanifestationen hervorzurufen (Wilske 1993/1994, Balmelli und Piffaretti 1995) und unterliegt in seiner Prävalenz regionalen Schwankungen (Fingerle et al. 2008). Dies ist besonders für die Impfstoffentwicklung auf der Basis des Oberflächenantigens OspA entscheidend.

Zielsetzung der Arbeit

Auch Koinfektionen der Zecken mit zwei weiteren Erregern (Anaplasmen und Rickettsien) sollen in einer parallel laufenden Dissertation (Krämer 2009) analysiert werden. Die vorliegende Arbeit liefert damit einen wesentlichen Beitrag zur Beurteilung des von Zecken ausgehenden Infektionsrisikos. Anhand der aufgezeigten Prävalenzen und der einzelnen Erreger, aber auch der Koinfektionen wird deutlich, dass weiterführende Untersuchungen zur Epidemiologie in anderen Regionen Deutschlands, den Erregerreservoirs oder der Seroprävalenz in der Bevölkerung und in Risikogruppen dringend notwendig sind. In diesem Zusammenhang ist eine erhöhte Aufmerksamkeit der klinisch tätigen Ärzte bezüglich seltener Zecken übertragener Erkrankungen, aber auch die Entwicklung und Evaluierung von diagnostischen Testsystemen für den Routinegebrauch unabdingbar.

4 Methoden

4.1 Sammeln der Zecken

Im Naherholungsgebiet Zeitgrund, 18 km von Jena entfernt, wurden im Zeitraum 2006/2007 saisonal Zecken gefangen. Die Lage des Habitats ist in Abb. 4.1.1 anhand einer Thüringenkarte dargestellt. Das Sammeln der Zecken fand in Abhängigkeit von der Witterung ein- bis zweimal im Monat statt. Die erste Saison erstreckte sich von Mai 2006 bis Oktober 2006 und die Zweite von April 2007 bis Oktober 2007. Die Fangsaison im Jahre 2007 konnte wegen des sehr milden Winters 2006/2007 bereits im April begonnen werden, da die Zecken zu diesem Zeitpunkt bereits aktiv waren.

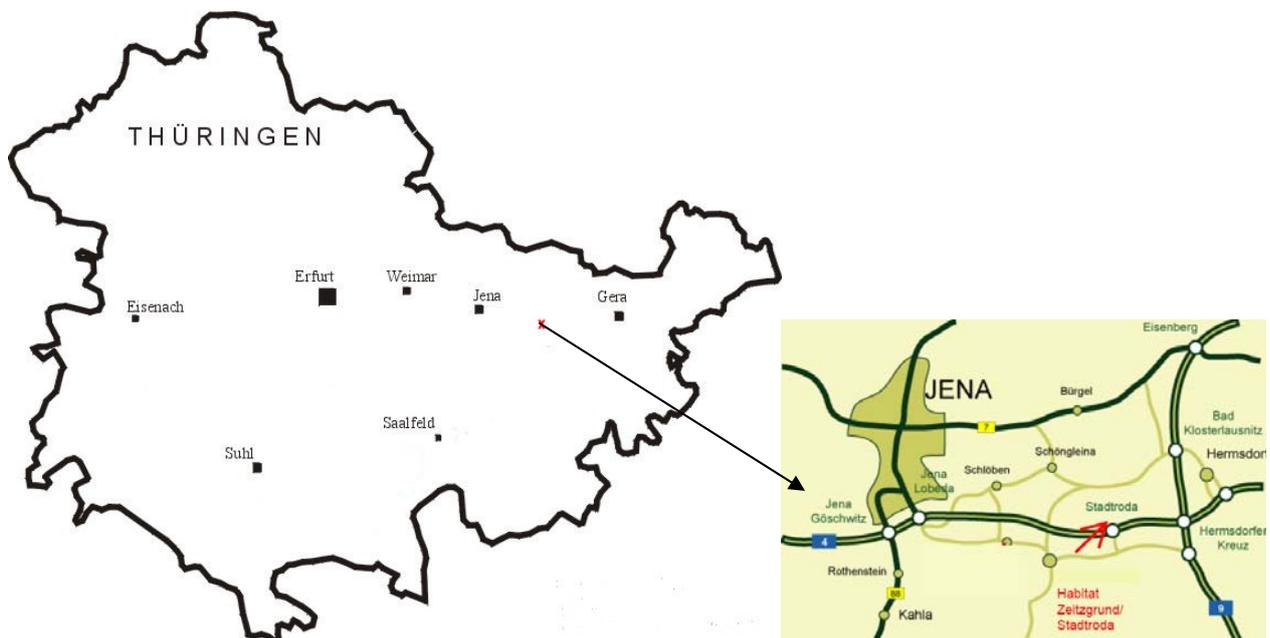


Abb. 4.1.1 Thüringenkarte mit der Lage des Habitates im Zeitgrund

Durch **x** wird die Lage von Stadroda mit dem Naherholungsgebiet Zeitgrund gekennzeichnet.

Ziel war es, insgesamt etwa 1000 Zecken in den einzelnen Entwicklungsstadien in verschiedenen Monaten zu erhalten. Beim Fang wurde eine Gleichverteilung von Nymphen, Männchen und Weibchen angestrebt. Das Fangen bzw.

Methoden

Sammeln der Zecken wurde mit Hilfe von weißen Fahnen nach der Methode des „Flaggings“ durchgeführt. Bei dieser Methode werden weiße Fahnen oder Lakentücher über den Wald- und Wiesenboden, insbesondere über niedrige Kraut- und Laubschichten, gezogen, wobei ein potenzielles Wirtstier den *Ixodes ricinus* Zecken imitiert wird. Durch die unterschiedliche Schlepphöhe war es möglich, alle Entwicklungsstadien abzustreifen. Besonders viele Zecken wurden in trockenem Laub, Unterholz und kurzem Gras gefunden, wobei festzustellen war, dass die adulten Tiere sonnige Regionen bevorzugten und wesentlich seltener anzutreffen waren. Die Sammlung erfolgte bei in etwa gleichen Witterungsbedingungen zur selben Tageszeit. Das Habitat, als Naherholungszentrum stark frequentiert von Joggern, Radfahrern und Touristen, liegt im Herzen von Thüringen zwischen Stadtroda und Hermsdorf (Abb. 4.1.1). Unterholz, Laub und Wiesen bieten dem Gemeinen Holzbock eine ideale Wirtspopulation. Entlang des Zeitzbachtales erstreckt sich der an der Seite des Zeitzbaches gelegene gut ausgebaute Hauptwanderweg, der einen schmalen Waldstreifen von einer Lichtung trennt (Abb. 4.1.2).



Abb. 4.1.2 Habitat entlang des Zeitzbaches

Es wurden im Durchschnitt zwischen 60 und 100 Zecken pro Monat von den Fahnen abgelesen (Tab. 4.1 u. Tab. 4.2) und bei -80°C bis zum Beginn weiterer Untersuchungen asserviert. Entwicklungsstadium, Fangdatum und Geschlecht wurden protokolliert.

Methoden

2006	Anzahl	Männchen	Nymphen	Weibchen
Mai	86	29	28	29
Juni	87	28	30	29
Juli	87	27	31	29
August	94	28	38	28
September	87	12	49	26
Oktober	65	17	30	18
Total	506	141	206	159

Tab. 4.1 Untersuchte Zecken im Jahr 2006

2007	Anzahl	Männchen	Nymphen	Weibchen
April	80	28	28	24
Mai	84	28	28	28
Juni	84	28	28	28
Juli	79	23	28	28
August	105	23	62	20
September	62	6	50	6
Total	494	136	224	134

Tab. 4.2 Untersuchte Zecken im Jahr 2007

4.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus den Zecken erfolgte mit dem „High Pure PCR Template Präparation Kit“ der Firma Roche. Die Zecken wurden einzeln mit einem sterilen Pistill zerdrückt und gemörsert. Dabei kam es zum Auspressen von Darminhalt, in welchem die gesuchten Erreger vermutet werden. Zum Lösen und Verdauen zellulärer Bestandteile kamen 200 µl Lysierungspuffer (Lysis Buffer) und 45 µl Proteinase K zum Einsatz. Proteinase K ist eine Serinprotease mit endo- und exoproteolytischer Aktivität. Nach kurzem Vortexen inkubierten die Proben über Nacht im Thermoblock bei 55°C. Nach ca. 14 bis 16 Stunden wurden 200 µl Bindungspuffer (Binding Buffer) hinzugefügt. Dieser erleichtert die Bindung der DNA an die Filter der Tubes. Nach gutem Durchmischen inkubierten die Proben für 10 Minuten bei 70°C. Dann gab man 100 µl Isopropanol hinzu, bevor der

gesamte Probeninhalt in das obere Reservoirgefäß des „High Pure Filter Tube“ mit Auffanggefäß pipettiert werden konnte. Schließlich erfolgte eine einminütige Zentrifugation der Probe bei 5200 g in der Eppendorfszentrifuge. Nach Verwerfen des Durchlaufs und Aufsetzen des Filtertubes auf ein neues Auffanggefäß waren 500 µl „Inhibitor Removal Buffer“ erforderlich. Mit dessen Hilfe wurden PCR-hemmende Kontaminationen entfernt. Anschließend wurden zwei Waschdurchläufe mit je 500 µl Waschpuffer durchgeführt. Zwischen diesen Schritten fand jedesmal eine Zentrifugation der Proben bei 8000 rpm und Verwerfung des Überstandes statt. Zur Entfernung von Ethanolresten wurden die Proben nach dem zweiten Waschschritt erneut für zwei Minuten bei 13780 g zentrifugiert. Schließlich folgte die Lösung der DNA vom Filter mit 100 µl auf 70°C vorgewärmtem Elutionspuffer. Um die Elutionsausbeute zu verbessern, erwies es sich als sinnvoll, die Proben zwei Minuten vor der abschließenden Zentrifugation (1 min/5200 g) stehen zu lassen. Die DNA wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Stichprobenartig erfolgte eine DNA-Konzentrationsbestimmung. Als Reinheitskontrolle der DNA-Extraktion durchlief jeweils ein nach 20 Proben mit 200 µl „phosphat buffered saline“ (PBS) gefülltes Tube alle DNA-Extraktionsschritte.

4.3 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde im Labor photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Aus der Extinktion der Lösung kann die Konzentration anhand der folgenden Verhältnisse berechnet werden:

Nach dem Lambert-Beer-Gesetz: $E = \epsilon \times c \times d$:

E = Extinktion

ϵ = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration

d = Schichtdicke

$OD_{260}=1$ entspricht 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger (ds) DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA und etwa 20 $\mu\text{g/ml}$ bei Oligonukleotiden. Dieses gilt für Nukleinsäuren bei einem pH-Wert von 7,0, die Messung sollte daher in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration (z.B. ein Tris-Puffer, pH=7,0) durchgeführt werden. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt bei 280 nm, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste. Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} zeigt an, wie stark eine DNA-Lösung noch durch Alkohol und Reste von Proteinen verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so ist der Wert signifikant kleiner. Stichprobenartig wurde die DNA-Konzentration aus den DNA-isolierten Zecken-Proben durchgeführt, um den Erfolg der durchgeführten Extraktion zu überprüfen und um systematische Fehler rechtzeitig erkennen zu können. Dabei wurde jeweils 1 μl unverdünnter Probenlösung auf die Messvorrichtung gegeben und das Verhältnis der Absorptionen bei OD_{260} zu OD_{280} bestimmt.

4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR) allgemein

Die PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem man *in vitro* gezielt DNA-Abschnitte enzymatisch vervielfältigen kann. Diese Abschnitte müssen kurz und in ihrer Basenabfolge genau definiert sein. Voraussetzungen für dieses Verfahren sind eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate als Bausteine für den zu synthetisierenden DNA-Strang und zwei Primer, um auf den beiden Einzelsträngen der DNA jeweils den Startpunkt der DNA-Synthese festzulegen. Die PCR erfolgt in 3 Schritten: Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei 95°C, „Primerannealing“, d.h. Anlagerung der Oligonukleotide und Extension bei 72°C. Diese Schritte werden in aufeinander folgenden Zyklen als sogenannte „Kettenreaktion“ mehrfach durchlaufen. Zur Extension wird die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, welche bei 95°C nicht denaturiert. Pufferlösungen mit Magnesiumionen sind für diese Polymerase essenziell (Appelhans et al. 1991). Die Primer werden so gewählt, dass sie die zu amplifizierende Sequenz einschließen. Der Vorwärts-Primer wird in 5`- zu 3`-Richtung abgeleitet der Rückwärts-Primer in 5`- zu 3`-Richtung

am Gegenstrang. Die Primer synthetisieren in der Extensionsphase mit Hilfe der Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) den Komplementärstrang. Diese Schritte werden mehrfach im Thermozykler durchlaufen, wobei die Anzahl der polymerisierten Sequenzfragmente mit zunehmender Zyklenzahl exponentiell ansteigt.

PCR-Ansatz:

Unter der Sterilbank wurde entsprechend der Probenanzahl ein Master-Mix hergestellt. Dieser setzte sich zusammen aus: dNTPs, 10x Puffer (Konzentration mit MgCl₂ und KCl), entsprechenden Primern, sterilem DEPC-Wasser, und der DNA-Polymerase. Die Zugabe der DNA erfolgte in einem separaten Raum. Zum Ausschluss von Kontaminationen in der PCR wurde eine Positivkontrolle, eine Negativ-Master-Mix-Kontrolle und die PBS Kontrolle aus dem DNA-Extraktions-Ansatz mitgeführt.

4.4.1 Borrelien Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch Amplifizierung eines Bereiches im *ospA*-Gen der Borrelien erfolgte der DNA-Nachweis dieses Erregers. Mit Hilfe nachfolgendem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP) erfolgte eine Speziesdifferenzierung. Nach Michel et al. (2004) und Lencakowa et al. (2006) wurde das PCR-Protokoll entsprechend unserer Geräte angepasst und abgewandelt. Die Primärampifikation erfolgte mit den Primern OspA-V1a und OspA-V1b und die sich anschließende „semi-nested“ PCR (Sekundärampifikation) mit den Primern OspA-V3a und OspA-V3b. In gegenläufiger Richtung wurden in beiden Fällen die Primer R1 und R37 verwendet. V1a und V1b, sowie V3a und V3b unterscheiden sich in ihrer Sequenz in nur einer Base (Tab. 4.3 Borrelien Primersequenzen). Anhand dieses Basenaustauschs (V1a/V1b „A/G“-Basenaustausch und V3a/V3b „T/C“-Basenaustausch) wird die Erfassung der verschiedenen Borrelienspezies möglich, die sich an dieser Stelle zum Teil unterscheiden. Je nach Spezies waren die Amplifikate nach Primär- und Sekundärampifikation unterschiedlich gross: Die Sequenzlänge von *B. afzelii* betrug nach erster Amplifikation 816 bp und nach Zweiter 798 bp, von *B. garinii* 807 und 798 bp, von *B. burgdorferi* sensu stricto 809 und 798 bp, von *B. valaisiana* 819 und 801 bp und von *B. lusitaniae* 825 und nach zweiter Amplifikation 807 bp.

Methoden

Primer	Amplifikation	Sequenz
V1a (vorwärts)	erste Amplifikation	5`- GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC-3`
V1b (vorwärts)	erste Amplifikation	5`- GGG GAT AGG TCT AAT ATT AGC-3`
V3a (vorwärts)	semi-nested Amplifikation	5`- GCC TTA ATA GCA TGT AAG C-3`
V3b (vorwärts)	semi-nested Amplifikation	5`- GCC TTA ATA GCA TGC AAG C-3`
R1 (rückwärts)	beide Amplifikationen	5`- CAT AAA TTC TCC TTA TTT TAA AGC-3`
R37 (rückwärts)	beide Amplifikationen	5`- CCT TAT TTT AAA GCG GC-3`

Tab. 4.3 Borrelien Primersequenzen

A-Adenin, C-Cytosin, T-Thymin, G-Guanin

```

1 caat t t t t t c t a t t t g t t a t t t g t t a a t c t t a t a c t a t a a t t a t a c t t g t a t t a a g t t a t a t
61 t a a t a t a a t a t a a a g g a g a a t a t a t t a t g a a a a a t a t t t a t t g g g a a t a g g t c t a a t a
121 t t a g c c t t a a t a g c a t g t a a g c a a a a t g t t a g c a g c c t t g a t g a a a a a a c a g c g c t t c a
181 g t a g a t t t a c c g g c g a a a t g a a a g t t c t t g t a a g c a a a g a a a a a a g a c a a a g a c g g t a a a
241 t a c a g t c t a g t g g c a a c a g t a g a c a a a g t t g a g c t t a a a g g a a c t t c t g a t a a a a c a a t
301 g g t t c t g g a a c a c t t g a a g g c g t a a a a g a t g a c a a a a g t a a a g t a a a a t t a a c a a t t t c t
361 g a t g a t c t a g g c g a a a c c a a a c t t g a a a c t t t c a a a g a a g a t g g a a c a t t a g t g t c a a g a
421 a a a g t a a a t t t c a a a g a c a a g t c t t t t c a c a g a a g a a a a a t t c a a t g a a a a a g g t g a a g t g
481 t c t g a a a a a t a c t a a c a a g a t c a a a c g g a a c t a c a c t t g a a t a c t c a c a a a t g a c a g a t
541 g c t g a a a a t g c t a c a a a a g c a g t a g a a a c t c t a a a a a a t g g c a t t a a g c t c c a g g a a a t
601 c t t g t a g g c g g a a a a c a a c a t t g a a a a t c a c a g a a g g t a c t g t t a c t t t a a g c a a g c a c
661 a t t g c a a a a t c t g g a g a a g t a a c a g t t g a a a t t a a c g a c a c t t c a a g c a c t c c a a a t a c t
721 a a a a a a a c t g g a a a a t g g g a t g c a a g a a a t t c a a c t t t a a c a a t t a t t g t t g a c a g c a a a
781 a a c a a g a c a a a a c t t g t a t t t a c a a a a c a a g a c a c a a t a a c a g t a c a a a g c t a t a a c c o t
841 g c a g g c a a c a a g c t a g a a g g t a c a g c a g t t g a a a t t a a a a c a c t t t c a a g a a c t t a a a a a c
901 g c t t t a a a a t a a g g a g a a t t a t g a a a c a a t a t t t a c t a g g a t t

```

Abb. 4.4.1 Auszug aus dem ospA Gen von B. valaisiana

In dieser Abbildung ist der Stamm VS116 des Borrelien ospA-Gens dargestellt. Diese Sequenz ist unter der Accessions No. AB016979 in der NCBI-Datenbank zu finden. Die Primersequenzen sind entsprechend gekennzeichnet. Die Fragmentgröße nach erster PCR entsprach einer Länge von 819 bp und nach zweiter PCR von 802 bp. Der Restriktionsort des beim RFLP geschnittenen Enzyms *HindIII* wurde eingezeichnet und die entsprechenden Primer **V1a** und **V3a**. (A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, T-Thymin)

Methoden

Reaktionsansatz Primäramplifikation/Sekundäramplifikation: (50 µl Ansatz)

Primäramplifikation		Sekundäramplifikation
dNTP	4 µl	dNTP
Puffer	5 µl	Puffer
Primer 1 (V1a, vorwärts)	0,5 µl	Primer 1 (V3a, vorwärts)
Primer 2 (V1b, vorwärts)	0,5 µl	Primer 2 (V3b, vorwärts)
Primer 3 (R1, rückwärts)	0,5 µl	Primer 3 (R1, rückwärts)
Primer 4 (R37, rückwärts)	0,5 µl	Primer 4 (R37, rückwärts)
Taq-Polymerase	0,25 µl	Taq-Polymerase
DEPC-Wasser	33,75 µl	DEPC-Wasser
DNA	5 µl	Amplifikat aus 1.PCR

Tab. 4.4 Borrelien: PCR-Ansatz

Als Positivkontrollen dienten Referenzstämme, die uns freundlicherweise von Professor Dorn vom Instituts für Ernährungswissenschaften aus Jena und von Professor Fingerle vom Max-von-Pettenkoffer-Institut aus München überlassen wurden. Die Stämme *B. burgdorferi* s.s. (PKa), *B. afzelii* (PKo), *B. garinii* (PBi), *B. garinii* (TN) stammen aus dem Max-von-Pettenkoffer Institut und *B. valaisiana* (VS116) aus dem Institut für Ernährungswissenschaften.

PCR-Bedingungen Primäramplifikation und „semi-nested“ PCR (je 30 Zyklen):

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	48°C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Finale Extension	72°C	7 min	
Abkühlung	4°C		

Tab. 4.5 Borrelien: PCR-Bedingungen im Thermozykler

4.4.2 Babesien Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zum Nachweis des 18S-rRNA-Gens der Babesien wurde mit Hilfe der Primer Bab 18S fw und Bab 18S rev ein 284 bp großer Abschnitt amplifiziert. Ein positives Amplifikat wurde in der Restriktionsanalyse oder durch eine nachfolgende PCR eines anderen 18S-rRNA Genabschnittes mit dem

Methoden

Primerpaar Bab 18S F3/18S R3 (582 bp großes PCR Produkt) bestätigt. Die Speziesdifferenzierung in *Babesia microti* oder *Babesia divergens* erfolgte in der anschließenden Sequenzierung. Die PCR des 284 bp Fragmentes wurde nach Hartelt und Mitarbeitern modifiziert (Hartelt et al. 2004) und die PCR des langen Fragmentes wurde von Dr. Hildebrandt, Institut für Medizinische Mikrobiologie Jena (unpublished) entwickelt. Die Positivkontrolle wurde freundlicherweise von Ute Mackenstedt aus der Parasitologie, Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt. In der Tabelle (Tab. 4.6) sind die Sequenzen der einzelnen Primer veranschaulicht.

Primer	Sequenz
Bab 18S fw (vorwärts)	5`- TAG RGA TTG GAG GTC GTC A-3`
Bab 18S rev (rückwärts)	5`- AAC GGA ATT AAC CAG ACA AA-3`
Bab 18S F3 (vorwärts)	5`- CCA GAC ATA GAG AGG ATT G-3`
Bab 18S R3 (rückwärts)	5`- CCT TCC GCA GGT TCA CC-3`

Tab. 4.6 Primersequenzen für Babesien-PCR

(A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, T-Thymin, R-Cytosin oder Guanin)

```
1 aacctggttg atcctgccag tagtcatatg cttgtcttaa agattaagcc atgcatgtct
61 tagtataagc tttatacag cgaaactgcg aatggctcat taaaacagtt atagtttatt
121 tgatgttcgt tttacatgga taaccgtggt aattctaggg ctaatacatg ctcgaggcgc
181 gttttcgcgt ggcgtttatt agactttaac caacccttcg ggtaatcggg gattcataat
241 aaattagcga atcgcatggc tttgccggcg atgtatcatt caagtttctg acctatcagc
301 tttggacggt agggatttgg cctaccgggg cgacgacggg tgacggggaa ttggggttcg
361 attccggaga gggagcctga gaaacggcta ccacatctaa ggaaggcagc aggcgcgcaa
421 attacccaat cctgacacag ggaggtagtg acaagaaata acaatacagg gcttaaagtc
481 ttgtaattgg aatgatggga atctaaacc ttcccagagt atcaattgga gggcaagtct
541 ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc aatagcgtat attaaagttg ttgcagttaa
601 gaagctcgta gttgaatttc tgccttgtca ttaatctcgc ttccgagcgt ttttttattg
661 acttggcatc ttctggattt ggtgccttcg ggtactatct tccaggattt accttgagaa
721 aactagagtg tttcaaacag gcattcgcct tgaatactac agcatggaat aatgaagtag
781 gactttggtt ctattttgtt ggttattgag ccagagtaat ggttaatagg agcagttggg
```

Methoden

841 ggcattcgta ttaactgtc agaggtgaaa ttcttagatt tgttaaagac gaactactgc
 901 gaaagcattt gccaaagatg ttttcattaa tcaagaacga aagttagggg atcgaagacg
 961 atcagatacc gtcgtagtcc taaccataaa ctatgccgac **tagagattgg aggtcgtcag**
18 S fw

1021 tttaaacgac tccttcagca cttgagaga aatcaaagtc tttgggttct ggggggagta
 1081 tggtcgcaag tctgaaactt aaaggaattg acggaagggc accaccaggc gtggagcctg
 1141 cggcttaatt tgactcaaca cgggaaacct caccaggtcc **agacatagag aggattgaca**
18S F3

1201 gattgat**agc tctttcttga** ttctatgggt ggtggtgcat ggccggttctt agttggtgga
Restriktionsenzym AluI

1261 gtgatt**ttgtc tggtaattc cgta**aacgaa cgagacctta acctgctaaa ttaggatctg
18 S rev

1321 ggacaagctt tgctgttcca gtatcgcttc ttagagggac tttgcgttca taaaacgcaa
 1381 ggaagtgtaa ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtctctgggct gcacgcgcgc
 1441 tacactgatg cattcaacga gtttttcctt ggccgtcggg tccgggtaat cttacagtat
 1501 gcatcgtgat ggggatagat tattgcaatt attaactttg aacgaggaat gcctagtagg
 1561 cgcgagtcat cagctcgtgc cgactacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgctcgtc
 1621 ctaccgatcg agtgatccgg tgaattattc ggaccaagaa acgtggattc gtccttcggt
 1681 ttttgaaag ttttgtgaac cttatcactt aaaggaagga gaagtcgtaa caaggttcc
 1741 gta**gggtaac ctgcggaagg** atcattc
18 S R3

Abb. 4.4.2 Auszug aus dem 18S rRNA Gen von *Babesia microti*

Abgebildet ist die Sequenz von *B. microti* mit der Accessionsnr. AY693840 der NCBI-Datenbank. In diese Sequenz wurden die Primer des **kurzen 284 bp** Fragmentes, des **langen 582 bp** Fragmentes und der Restriktionsort des Enzyms **AluI** eingezeichnet.

(A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, T-Thymin, die Zahlen am linken Rand geben die Basenpaarlänge an)

Kurzes Fragment (284 bp)		Langes Fragment (582 bp)
dNTP	4 µl	dNTP
Puffer	5 µl	Puffer
Primer 1 (Bab fw)	0,5 µl	Primer 1 (18S F3)
Primer 2 (Bab 18S rev)	0,5 µl	Primer 2 (18S R3)
Taq-Polymerase	0,25 µl	Taq-Polymerase
DEPC-Wasser	34,75 µl	DEPC-Wasser
DNA	5 µl	DNA

Tab. 4.7 Babesien: PCR-Ansatz

Methoden

PCR-Bedingungen 284 bp großes

Amplifikat

Initiale Denaturierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	45 sec	} 35 Zyklen
Annealing	55°C	45 sec	
Extension	72°C	1 min	
Finale Extension	72°C	7 min	

PCR-Bedingungen 582 bp großes

Amplifikat

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	} 35 Zyklen
Annealing	56°C	1 min	
Extension	72°C	1,30 min	
Finale Extension	72°C	7 min	
Abkühlung	4°C		

Tab. 4.8 Babesien: PCR-Bedingungen im Thermozykler

4.5 Agarose-Gelelektrophorese

4.5.1 Agarose-Gelelektrophorese allgemein

Dieses molekularbiologische Verfahren dient zur Visualisierung von PCR-Produkten (Adkins und Burmeister 1996). Dabei werden DNA- oder RNA-Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe und Ladung getrennt. Die Größenbestimmung erfolgt anhand von Strängen bekannter Größe (DNA-Marker). Da DNA aufgrund der Zucker-Phosphatgruppe negativ geladen ist, wandert sie stets zur Anode. Kurze DNA-Fragmente wandern schneller als lange und ringförmige schneller als lineare DNA-Moleküle. Im Agarosegel werden lange Fäden aus Agarosepolymeren miteinander vernetzt. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto kleiner sind die Poren, die sich im Gel befinden. Kleine Poren werden zur Trennung kleiner Nukleinsäure-Fragmente und große Poren für große Fragmente verwendet. Nukleinsäuren sind nativ nicht sichtbar. Deswegen erfolgt die Zugabe des DNA-Ladepuffers Orange-G-Glyzerin-EDTA

und 5 µl/100 ml des Farbstoffes SYBR-Green I[®]. Dieser Farbstoff bindet doppelsträngige DNA und bildet somit einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, der blaues Licht bei einer Wellenlänge von 498 nm absorbiert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von 522 nm emittiert. Somit können DNA-Proben unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Appelhans et al. 1991, Sachse 2008).

4.5.2 Borrelien-Gelelektrophorese

Die Visualisierung und Trennung der Borrelien-PCR-Produkte erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese mit einem 2%-igen Gel (2 g Agarose/100 ml TAE-Puffer). Die erwarteten Fragmentgrößen betragen 807-825 bp für das erste PCR-Produkt und 798-807 bp für das zweite. Von den positiven Amplifikaten der Sekundäramplifikation ('semi-nested' PCR) in entsprechender Bandenhöhe wurde ein Restriktionsverdau zur Speziestypisierung des *Borrelia burgdorferi* sensu lato- Komplexes durchgeführt. Die Darstellung des Restriktionsergebnisses erfolgte ebenfalls in einem 2%-igem Gel. War diese Typisierung nicht möglich, erfolgte eine Sequenzierung.

4.5.3 Babesien-Gelelektrophorese

Die erwartete Fragmentgröße im 2%-igen Agarosegel betrug nach der ersten PCR 284 bp, nach der zweiten PCR 582 bp. Die Proben, die eine Bande in entsprechender Höhe aufwiesen, wurden im Restriktionsverdau mit dem Enzym Alu I bearbeitet. Weiterhin wurden alle als positiv bewerteten Proben unter UV-Licht ausgeschnitten und sequenziert.

4.6 Restriktionsverdau allgemein

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an kurzen definierten Sequenzregionen spalten (Fraser et al. 1997). Die Erkennungssequenz dieser Reaktionsenzyme besteht meist aus palindromischen Sequenzen von 4, 6 oder 8 Basenpaaren. Über die Länge der DNA-Fragmente, die beim Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme entstehen, können DNA-Abschnitte im Vergleich mit einer Restriktionskarte identifiziert werden. Dieses Verfahren nennt man Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP).

4.6.1 Borrelien Restriktionsverdau

Zur Differenzierung der Borrelienspezies positiver PCR-Produkte dienten nach der Vorlage von Michel und Mitarbeitern (Michel et al. 2004) fünf verschiedene Enzyme (*Kpn2I*, *BglII*, *SfuI*, *SspI* und *HindIII*). Zusätzlich wurden *B. garinii* OspA Serotyp 6 und *B. valaisiana* mit dem Enzym *XbaI* nach Lencakova et al. (2006) geschnitten und die Spezies *B. garinii* Serotyp 6 und 8 bzw. *B. valaisiana* subgroup II und *B. spielmanii* zu differenzieren. Aufgrund lokaler Sequenzunterschiede der Borrelienspezies, besitzen diese im *ospA*-Gen individuelle Restriktionsorte für die einzelnen Enzyme (Tab. 4.9).

Restriktionsenzym	Restriktionsort
<i>Kpn2I</i>	5'-T [^] C C G G A-3'
	3'-A G G C C [^] T-5'
<i>BglII</i>	5'-A [^] G A T C T-3'
	3'-T C T A G [^] A-5'
<i>SfuI</i>	5'-T T [^] C G A A-3'
	3'-A A G C [^] T T-5'
<i>SspI</i>	5'-A A T [^] A T T-3'
	3'-T T A [^] T A A-5'
<i>HindIII</i>	5'-A [^] A G C T T-3'
	3'-T T C G A [^] A-5'
<i>XbaI</i>	5'-T [^] C T A G A-3'
	3'-A G A T C [^] T-5'

Tab. 4.9 Borrelien: Übersicht Schnittstellen der Restriktionsenzyme

Das Symbol ^ markiert jeweils die Sequenzstelle, an der das entsprechende Enzym schneidet.

Die Tabelle (Tab. 4.10) veranschaulicht die unterschiedlichen Restriktionsmuster einzelner Borrelienspezies.

Methoden

Spezies	Stamm	OspA Typ	Kpn2I	BglII	SfuI	SspI	HindIII	XbaI
<i>B. b. ss</i>	PKa	1	798	798	798	534/264	654/144	a
	CA8	1	429/369	798	798	534/264	654/144	a
<i>B. afzelii</i>	PKo	2	798	798	537/261	798	798	a
<i>B. garinii</i>	PBr	3	429/372	758/43	801	801	801	a
	PBi	4	798	556/242	798	798	798	a
	Phei	5	549/195/54	798	798	798	654/144	a
	TN	6	429/252/120	801	801	801	657/144	606/122/73
	PRef	7	428/372	758/43	801	801	657/144	a
	PKi	8	801	801	801	801	585/144/72	725/76
	VS116	-	801	801	801	801	465/336	798
<i>B. valaisiana</i> subgroup I								
<i>B. valaisiana</i> subgroup II	NE231	-	798	665/133	798	798	665/133	556/242
<i>B. lusitanae</i>	PotiB2	-	807	807	807	466/341	402/284/72/49	a
<i>B. spielmanii</i>	A14S	-	798	665/133	798	798	665/133	798

Tab. 4.10 Borrelien: Spezieszuordnung nach dem RFLP Muster

Diese Tabelle wurde modifiziert abgebildet nach Michel et al. (2004) und Lencakowa et al. (2006). Erkennbar sind die einzelnen Borrelien-Stämme und die entsprechenden Fragmentlängen nach Restriktionsverdau der einzelnen Enzyme. (a-Restriktion wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt)

Im Labor für medizinische Mikrobiologie der Friedrich-Schiller-Universität stehen durch das Max-von-Pettenkofer Institut (München) die 4 Referenzstämme: *B. burgdorferi* s.s. (PKa), *B. afzelii* (PKo), *B. garinii* (PBi), *B. garinii* (TN) und der Stamm *B. valaisiana* (VS116) vom Institut für Ernährungswissenschaften (Jena) zur Verfügung. Von jedem positivem 'semi-nested' PCR-Amplifikat wurden je fünf Restriktionsreaktionen angesetzt, so dass jedes Enzym anschließend gesondert beurteilt werden konnte. *B. garinii* Serotyp 6 und Serotyp 8 weisen das selbe Restriktionsmuster beim Verdau nach der Methode von Michel und Mitarbeitern (Michel et al. 2004) auf, genauso wie *B. valaisiana* „subgroup II“ und der Stamm A14S. Zur Differenzierung dieser Subtypen wurde ein Verdau mit dem Enzym XbaI von diesen Proben durchgeführt, wie bereits von Lencakowa und Mitarbeitern (Lencakowa et al. 2006) beschrieben. Dabei wurden folgende Bedingungen beim Restriktionsverdau erfüllt:

Methoden

Restriktionsansatz:

- Puffer	2 µl
- DEPC- Wasser (Aqua dest.)	12,5 µl
- Enzyme (<i>Kpn2I</i> , <i>BglII</i> , <i>Sful</i> , <i>Sspl</i> , <i>HindIII</i> , <i>XbaI</i>)	0,5 µl
- Amplifikat	5 µl

Restriktionsbedingungen:

Thermoblock für *Kpn2I* 55°C

Brutschrank für *BglII*, *Sful*, *Sspl*, *HindIII*, *XbaI* 37°C

Die aliquotierten PCR-Proben wurden 1-16 Stunden bei 55°C (*Kpn2I*) und 37°C (*BglII*, *Sful*, *Sspl*, *HindIII*, *XbaI*) mit dem entsprechenden Enzym inkubiert. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte elektrophoretisch in einem 2%-igen Agarosegel und ermöglichte die Zuordnung zu einer Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes.

4.6.2 Babesien Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI* diente als Bestätigung und zur weiteren Charakterisierung der positiven Amplifikate aus der Babesien-PCR.

Restriktionsansatz:

- Puffer	1 µl
- Enzym <i>AluI</i>	0,5 µl
- Amplifikat	8,5 µl

Es wurden alle Amplifikate, die eine entsprechende Bande in erwarteter Höhe von 284 bp in der vorhergehenden Agarose-Gelelektrophorese aufwiesen, nach diesem Verfahren bearbeitet und weiter untersucht. Die zum Verdau angesetzten PCR-Proben inkubierten zwischen 1 bis maximal 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank mit dem Restriktionsenzym *AluI*. Anschließend erfolgte die Darstellung der Fragmente in einem 2%-igen Agarosegel. Bei nicht eindeutigem oder schwachem Restriktionsergebnis wurde eine weitere PCR eines anderen Abschnittes des 18S-rRNA-Gens durchgeführt. Im Restriktionsverdau oder in der zweiten PCR als positiv bestätigte Proben wurden dann mittels Sequenzierung weiter charakterisiert.

Restriktionsenzym	Restriktionsort
	5'-A G [^] C T-3'
<i>AluI</i>	3'-T C [^] G A-5

Tab. 4.11 Babesien: Schnittstelle des Restriktionsenzymes

4.7 Sequenzierung

Die PCR-Bande, die sich in entsprechender Höhe befand, sowohl für *Borrelia burgdorferi* s.l. als auch für *Babesia* spp., wurde unter UV-Licht mit einem scharfen Einmalskalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Mit Hilfe des „Agarose Gel Extraktions-Kit“ erfolgte die DNA-Extraktion aus dem Gel. Aus diesem Kit wurden 400 µl Extraktionspuffer zur ausgeschnittenen Bande in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Darauf folgend inkubierte die Probe im Heizblock mit integriertem Mixer bei 60°C bis sich die Gelbande komplett aufgelöst hatte. Nach Umfüllen der Probe in ein Filtrertube zentrifugierte diese Probe für 1-2 Minuten bei 10000 rpm (8160g). Es folgte ein doppelter Waschgang mit zuerst 500 µl dann 750 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation. Damit Reste des Ethanols aus dem zugegebenen Puffer entfernt werden konnten, erfolgte eine abschließende Zentrifugation der Probe. Das Auffanggefäß wurde durch ein neues 1,5 ml-Tube ersetzt. Bei der folgenden Elution wurden 30 µl DEPC-Wasser mit 5-minütiger Einwirkzeit verwendet. Dadurch konnte die DNA vom Filter des Filtrertubes gelöst werden. Zur Konzentrierung des DNA-Produktes wurde die Probe in einer Vakuumzentrifuge auf etwa 10 µl eingeeengt. In der Sequenz-PCR erfolgte die Markierung der zur Sequenzierung anstehenden Sequenzabschnitte. Folgender Ansatz und Bedingungen im Thermozykler waren dazu notwendig:

PCR-Ansatz:

- 5 µl extrahierte DNA
- 4 µl Premix (Nukleotide und Fluoreszenzfarbstoff)
- 1 µl Primer

Methoden

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung	94°C	20 sec	} 25 Zyklen
Annealing	55°C	15 sec	
Extension	60°C	1 min	
Ende	4°C		

Tab. 4.12 Sequenzierung: PCR-Bedingungen

Für diese Reaktion mittels des „DYEnamic ET Terminator cycle Kit“ wurden Desoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Bei der DNA-Elongation mittels hitzestabiler Taq-Polymerase führten die fluoreszenzmarkierten Primer zum Kettenabbruch in der Polymerisierungsreaktion. Dieser statistische Kettenabbruch fand nach dem Prinzip von Sanger statt (Sanger et al. 1977). Als nächstes Verfahren wurde eine Ethanol-fällungsreaktion der markierten DNA-Fragmente durchgeführt. Es wurden zuerst jeweils 1 µl EDTA-Na-Acetat und anschließend 38 µl absoluter Alkohol (99,8%-ig) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 11750 g und vorsichtigem Abschütten des Überstandes, erfolgte die Zugabe von 700 µl gekühltem 70%-igem Alkohol. Der Alkohol wurde wieder vorsichtig vom Pellet abgegossen. Nach erneuter Zentrifugation, 5 Minuten bei 11773 g, gab man die Proben zum Trocknen in eine Vakuumzentrifuge. Die Probe wurde dann in 10 µl Megabase-Lösung resuspendiert. Schlussendlich wurde diese Lösung für 20 Sekunden gevortext und zentrifugiert. Die Sequenzanalyse beruht auf dem Prinzip, dass die Didesoxynukleotide aller vier Basen jeweils mit einem individuellen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind (Abb. 4.7.1). Diese markierten Fragmente werden in einem hochauflösenden, harnstoffhaltigen Sequenzgel mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Lasergestützt erfolgt die Auswertung der Basenabfolge der Abbruchsleiter. An einem Computer werden diese Rohdaten durch die Software (Sequenz Analysis 3.7) in die entsprechende Sequenz umgerechnet. Der Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen erfolgte im Internet unter der Adresse: „<http://www.ncbi.nih.nlm.gov/>“.

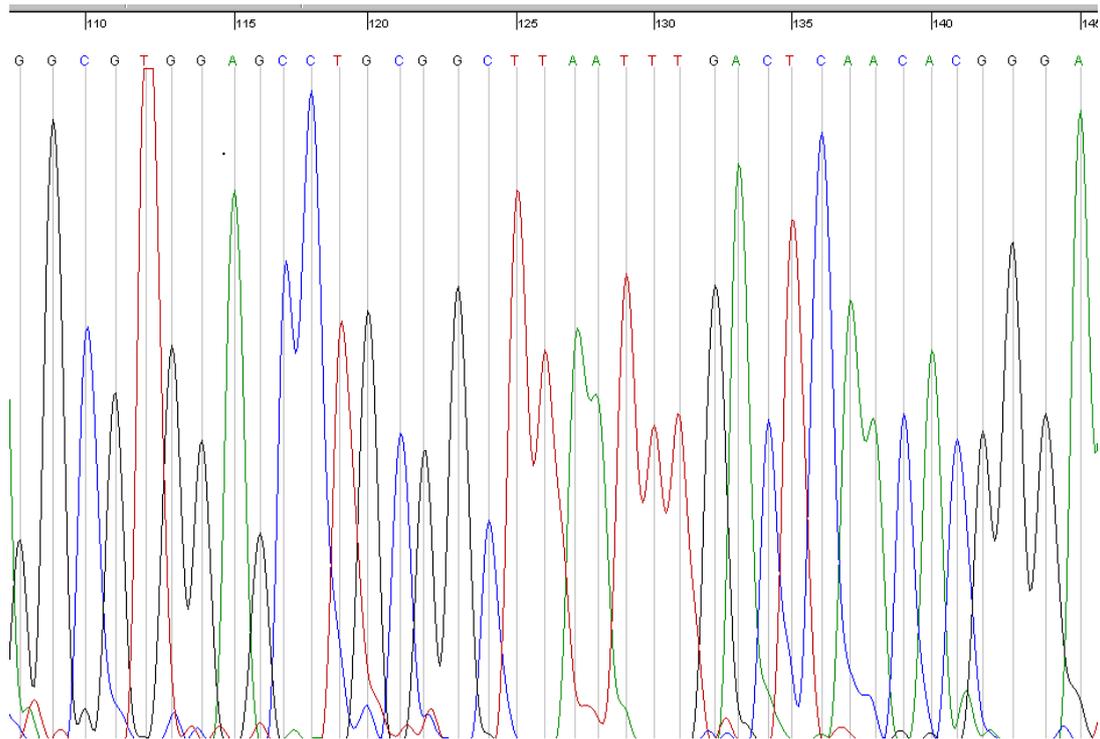


Abb. 4.1 Sequenzausschnitt *Babesia microti*

Hier wurde ein Sequenzabschnitt der babesien-positiven Probe 515 (vorwärts) veranschaulicht. Die verschiedenen Farben entsprechen den einzelnen Purin- und Pyrimidinbasen der DNA-Sequenz.

Guanin (G)-schwarz, Adenin (A)-grün, Cytosin (C)-blau, Thymin (T)-rot

4.8 Statistik

Konfidenzintervalle, d.h. die Intervalle, in denen sich der wahre Wert der Prävalenz um den zuvor errechneten Prozentwert bewegt, wurden für einen Vertrauensbereich von 95% errechnet (<http://faculty.vassar.edu/lowry/prop1.html>). Zum Vergleich der einzelnen Prävalenzen wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet und der Wert der Wahrscheinlichkeit (p), dass zwei Gruppen identisch sind, über SPSS (Version 15) berechnet. Der erhaltene Wert wurde folgendermaßen interpretiert: ein Wert von 5,0% oder mehr zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Klassen existiert; die Nullhypothese muss beibehalten werden. Ein Wert kleiner als 5,0% hingegen bezeichnet einen signifikanten Unterschied. Ist der Wert unter 1,0%, gilt dies als hochsignifikant.

5 Materialien

5.1 DNA-Extraktion

Reagenzien:

“High Pure PCR Template Preparation Kit” von Roche Diagnostics

<i>darin enthalten:</i>	Proteinase K
	Lysispuffer
	Bindungspuffer
	„Inhibitor Removal” Puffer
	Waschpuffer
PBS Puffer	phosphate buffered saline
Ethanol	99,8%
Isopropanol	99,7%
DEPC Wasser	Wasser für Molekularbiologie DEPC behandelt (Roth)
	H ₂ O-M 18,01 g/mol

Geräte:

Sterile Pinzetten, Scheren, Petrischalen, Pistillen, Pipetten (Eppendorf), Reaktionsgefäße 1,5 ml und 0,5 ml (Mini tube Eppendorf), Vortexer (Heidolph Reax 2000), Zentrifugen (Centrifuge 5415 D und 5415 C Eppendorf), Thermoblock (Eppendorf Thermomixer Comfort)

5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Reagenzien:

dsDNA aus DNA Extraktion der Zecken

Aqua destillata (Ampuwa)

Geräte:

Pipetten (Finnpipette Campus), (BioHit Proline), Nano Drop[®]ND-1000 Spektrometer (PEQ Lab Biotechnologie GmbH)

5.3 PCR

Reagenzien:

10 x Ex Taq-Puffer (Konzentrat mit MgCl₂, KCl und Mercaptoethanol)

Materialien

dNTP „Mixture“ (je 2,5 mM aATP, dCTP, dGTP, dTTP), DEPC behandeltes Wasser für Molekularbiologie (Roth), rekombinante Taq-DNA-Polymerase (5 units/ μ l) TAKARA Ex Taq™ (Takara BIO INC.)

Primer: hergestellt vom Institut für Virologie der FSU Jena

Primer	Sequenz
V1a (vorwärts)	5`- GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC-3`
V1b (vorwärts)	5`- GGG GAT AGG TCT AAT ATT AGC-3`
V3a (vorwärts)	5`- GCC TTA ATA GCA TGT AAG C-3`
V3b (vorwärts)	5`- GCC TTA ATA GCA TGC AAG C-3`
R1 (rückwärts)	5`- CAT AAA TTC TCC TTA TTT TAA AGC-3`
R37 (rückwärts)	5`- CCT TAT TTT AAA GCG GC-3`
Bab 18S fw (vorwärts)	5`- TAG R GAT TGG AGG TCG TCA-3`
Bab 18S rev (rückwärts)	5`- AAC GGA ATT AAC CAG ACA AA-3`
Bab 18S F3 (vorwärts)	5`- CCA GAC ATA GAG AGG ATT G-3`
Bab 18S R3 (rückwärts)	5`- CCT TCC GCA GGT TCA CC-3`

Tab. 5.1 Primer

(A-Adenin, C-Cytosin, G-Guanin, R-Cytosin oder Guanin, T-Thymin)

DNA für Positivkontrollen:

Die Stämme PKo (*Borrelia afzelii*), PBi (*Borrelia garinii*), PKa2 (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto) und VS116 (*Borrelia valaisiana*) dienen als Positivkontrollen bei der Borrelien-PCR und stammen vom Institut für Ernährungswissenschaften Jena sowie vom Max-von-Pettenkoffer Institut München (siehe Seite 28). Die Babesien-Positivkontrolle wurde freundlicherweise von Ute Mackenstedt des Instituts für Parasitologie der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt.

Geräte:

Pipetten (Eppendorf References), Kühlständer (Eppendorf), Sterilbank (Hera Safe Heraeus Instruments GmbH), Zentrifuge (Centrifuge 5415 A Eppendorf), PCR Tubes 0,2 ml (Biozym Scientific GmbH), 1,5-ml-Tube (Eppendorf), Thermozykler (T3000 Biometra® Thermocycler), Mikrozentrifuge (Roth Micro Centrifuge Serial no. 040092)

5.4 Gelelektrophorese

Reagenzien:

Orange G-Glyzerin-EDTA (Sigma Aldrich Hamburg)

SYBR-Green I[®] (Biozym Oldendorf)

1x TAE-Puffer: hergestellt aus 50x TAE-Puffer

50x TAE-Puffer: 242 g Tris-Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5M EDTA pH 8, 0

DNA-Marker: "AmpliSize[™] Molecular Ruler" 50-2000 bp Ladder (BioRAD München)

Geräte:

Spatel, Waage (Kern 440-33), Mikrowelle (Samsung Classic Collection), Elektrophoresekammer (BioRAD DNA Sub Cell[™], Wide Mini Sub[™] Cell und Whatman Biometra[®]), Stromversorgungsgerät (BioRAD, Power Pac 300), UV-Photogerät (Image Master[®] VDS Pharmacia Biotech), Computer (Green energy 50x Max), Pipetten (Eppendorf)

Ausschneiden der Banden:

Einwegskalpell, 1,5 ml-Reaktionsgefäß (Eppendorf), UV-Transilluminator

5.5 Restriktionsverdau Borrelien

Reagenzien:

DEPC behandeltes Wasser für Molekularbiologie (Roth)

10 µl Amplifikat aus oben genannter Borrelien-PCR

Restriktionsenzyme: *Kpn2I* (*BspMII*) 10 units/µl (Fermentas)

BglII 10 units/µl (Fermentas)

SfuI (*AsuII*) 10 units/µl (Roche Diagnostics)

SspI 10 units/µl (Fermentas)

HindIII 10 units/µl (Fermentas)

XbaI 10 units/µl (Fermentas)

Geräte:

Pipetten (Eppendorf), Thermoblock (Eppendorf Thermomixer Comfort), Brutschrank (memmert), 1,5 ml Tubes (Eppendorf)

5.6 Restriktionsverdau Babesien

Reagenzien:

Amplifikate aus oben genannter Babesien-PCR

Restriktionsenzym *A*/*ul* 10 units/ μ l (Fermentas)

Geräte:

Pipetten (Eppendorf), Brutschrank (memmert), 1,5-ml-Tubes (Eppendorf)

5.7 DNA-Extraktion aus dem Gel

Reagenzien:

„Agarose Gel Extraction Kit“ (Jena Bioscience), DEPC-Wasser (Roth), Megabase Solution (GE Healthcare UK)

Geräte:

Vakuumzentrifuge (DNA Speed vac DNA110 Savant), Pipetten (Finnpipette Campus), Vortexer (neo lab), Zentrifuge (Centrifuge Eppendorf 5415C), Minizentrifuge (Roth), Heizblock (Temperiergerät T15 Adw Zimet), Thermomixer (Eppendorf Thermomixer comfort)

5.8 Sequenzierung

Reagenzien:

„DYEnamic ET Terminator cycle Kit“ (GE Healthcare UK), Primer (siehe Tabelle (Tab. 5.1), Institut für Virologie FSU Jena), Ethanol (99,8%), Ethanol (70,0%)

Geräte:

Thermozykler (Master Cycler Eppendorf), Sequenzer (ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems), Sequenzierungssoftware („Sequence Analysis“ 3.7), PC, Stoppuhr (Digital Timer Huger), Zentrifuge (Centrifuge Eppendorf 5415C), Pipetten (Finnpipette Campus), Vakuumzentrifuge (DNA speed vac. DNA 110 Savant), Heizblock (Temperiergerät T15 AdW ZIMET)

5.9 Software

Statistik: Programm: SPSS Version 15.0

Computer Software- und Bildbearbeitungsprogramme: Microsoft Office Word 2003, Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Office Power Point 2003, Adobe Acrobat Professional 7.0, Jasc Paintshop Pro 9.0, EndNote Version 9.0

6 Ergebnisse

6.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Aufgrund morphologischer Unterschiede der Zecken bei Männchen, Weibchen und Nymphen stand auch eine jeweils unterschiedliche Menge an Ausgangsmaterial für die DNA-Extraktion zur Verfügung. Entsprechend der Größenverhältnisse Weibchen > Männchen > Nymphen zeigten sich auch Unterschiede in der Gesamt-DNA-Konzentration. Die durchschnittlichen Konzentrationen der extrahierten Zecken-DNA sind für die verschiedenen Entwicklungsstadien in der Tabelle (Tab. 6.1) dargestellt.

Entwicklungsstadium	DNA-Konzentration			
	Mittelwert ng/µl	Median ng/µl	Maximum ng/µl	Minimum ng/µl
Nymphe	10,79	8,8	30,8	1,2
Weibchen	24,06	21,8	44,6	4,5
Männchen	15,52	13,9	43,3	3,2

Tab. 6.1 Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung

Im Rahmen der photometrischen Konzentrationsauswertung traten bei den Weibchen und Männchen entsprechend ihrer Größenverhältnisse größere DNA-Konzentrationswerte auf.

Ergebnisse

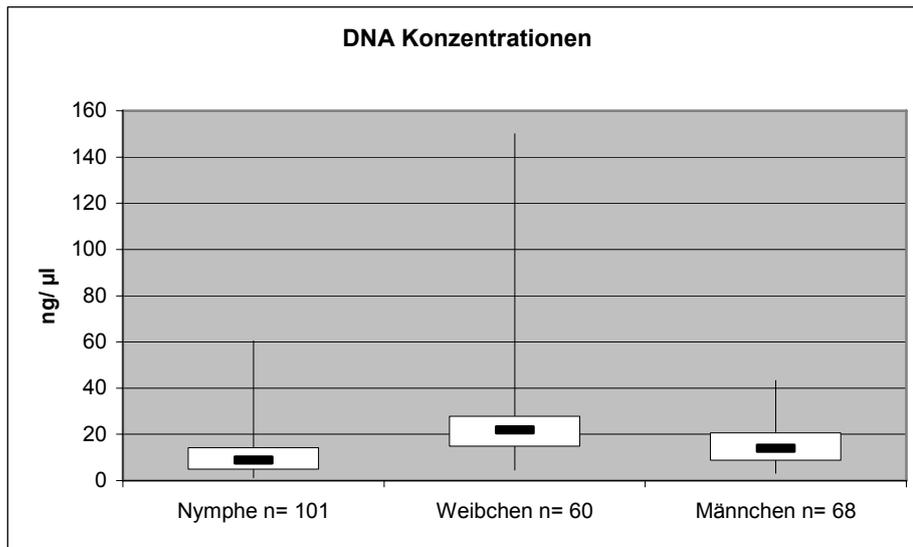


Abb. 6.1.1 Boxplot DNA-Konzentration

In der Abbildung sind die unterschiedlichen DNA-Konzentrationen der einzelnen Entwicklungsstadien als Boxplot dargestellt. Auf diese Weise wurden die Ergebnisse um Ausreißerwerte korrigiert. Weibchen haben die höchsten DNA-Konzentrationen, aber auch die größten Streubreiten.

6.2 Methodenevaluation

Mittels PCR wurde die aus den Zecken extrahierte DNA auf Borrelien und Babesien untersucht. Bei den molekularbiologischen Nachweisverfahren zur Detektion von Borrelien (im Schaubild hell hinterlegt) war es nötig, zur Erhöhung der Sensitivität eine zweite 'semi-nested' PCR durchzuführen. Damit konnte in 286 Proben eine borrelienspezifische Bande nachgewiesen werden. Zur Bestätigung und Subtypermittlung wurde nachfolgend ein Restriktionsverdau (RFLP) veranlasst. Nur 20 Proben konnten dabei nicht näher charakterisiert werden. In diesem Fall erfolgte die Bestätigung der positiven PCR mit Hilfe der Sequenzierung. Bezüglich der Babesien (im Schaubild grau hinterlegt) gestaltete sich der Nachweis insofern etwas schwieriger, dass nach der PCR in der Gelelektrophorese unspezifische Banden auftraten. Die Sensitivität der Babesien PCR war zu Lasten der Spezifität sehr hoch. Um möglichst alle positiven Isolate zu erfassen, wurden viele der unspezifischen Banden ebenfalls dem Restriktionsverdau zugeführt. Dadurch ergaben sich in einigen Fällen fragliche Ergebnisse der Restriktion (115). Es wurde von diesen als fraglich klassifizierten Proben eine zweite PCR

Ergebnisse

eines größeren (582 bp) Fragmentes des 18S-rRNA-Gens der Babesien durchgeführt, wobei sich diese PCR als durchaus spezifischer erwies. Die Sequenzierung diente als endgültiger Erregernachweis. Mittels dieser zweiten PCR traten kaum unspezifischen Banden auf. Es konnten nach abschließender Sequenzierung noch 7 weitere Proben als positiv identifiziert werden. Somit ergab sich eine Gesamtinfektionszahl von 50 Babesien-positiven Proben.

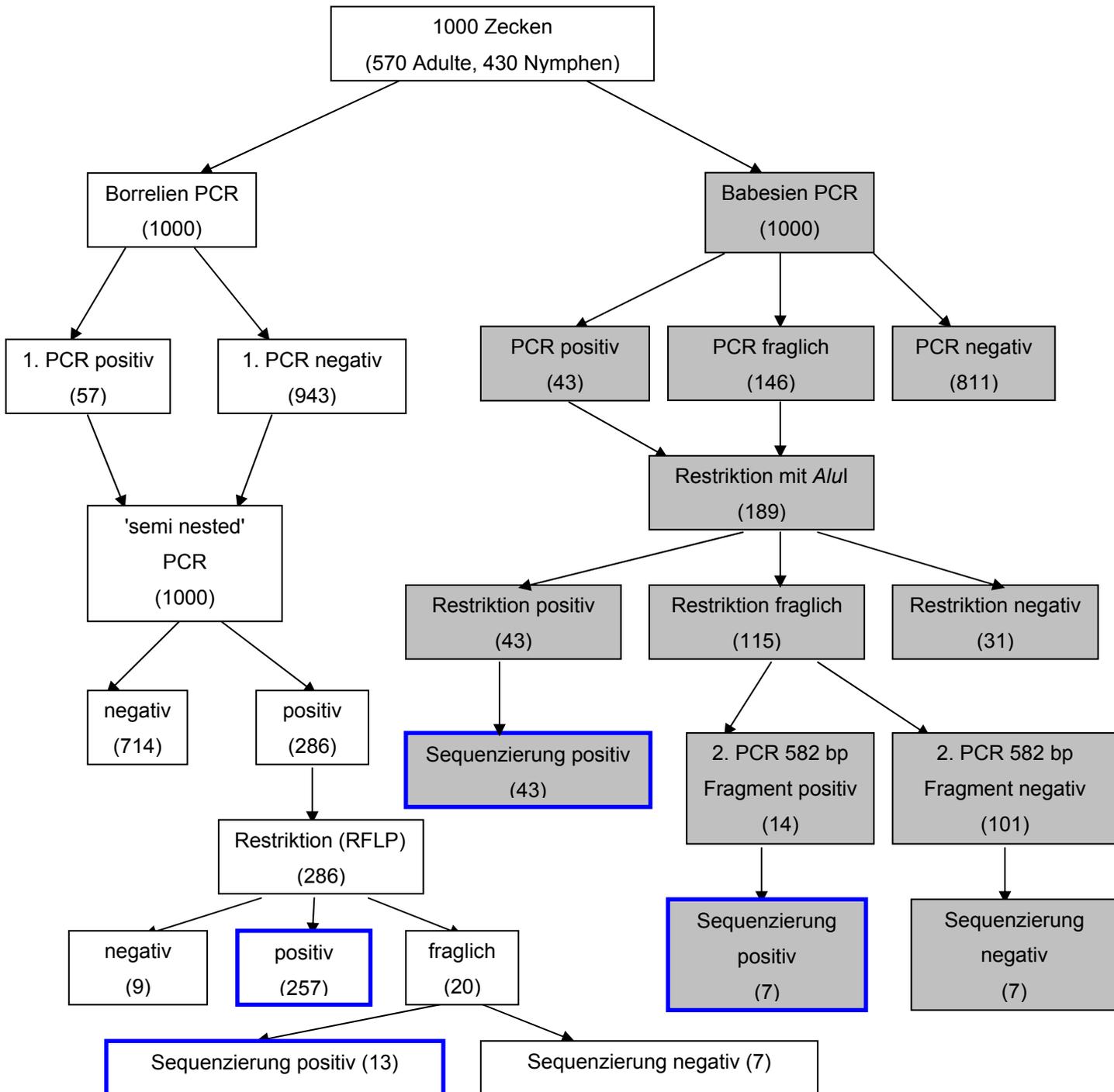


Abb. 6.2.1 Schaubild Methodenkritik

In dem Schaubild (Abb. 6.2.1) wurde das molekularbiologische Vorgehen zur Ermittlung von borrelien- und babesienpositiven Zecken abgebildet. (hell hinterlegt-Borrelienuntersuchungen, grau hinterlegt-Babesienuntersuchungen, blau gerahmt-endgültig als borrelien- oder babesien-positiv klassifizierte Proben)

6.3 Borrelienuntersuchungen

6.3.1 Ergebnisse der Borrelien-PCR durch Amplifikation des *ospA*-Gens

Mit den *OspA*-Primern V1a, V1b in der Primärampifikation und V3a, V3b in der Sekundärampifikation ('semi-nested' PCR) sowie den Rückwärtsprimern R1 und R37 sollten die verschiedenen Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-(Bbsl)-Komplexes erfasst werden wie bereits von Michel et al. (2004) beschrieben. Je nach Spezies waren die Amplifikate nach Primär- und Sekundärampifikation unterschiedlich gross: Die Sequenzlänge von *B. afzelii* betrug nach erster Amplifikation 816 bp und nach Zweiter 798 bp, von *B. garinii* 807 und 798 bp, von *B. burgdorferi* sensu stricto 809 und 798 bp, von *B. valaisiana* 819 und 801 bp und von *B. lusitaniae* 825 und nach zweiter Amplifikation 807 bp. Diese immense Spanne in der Anzahl der Basenpaare kommt durch die Heterogenität der Spezies im *ospA*-Gen zustande.

Nach der Primärampifizierung zeigte sich meist noch keine eindeutig positive Bande der erwarteten DNA-Sequenzlänge von 807-825 bp im Agarosegel. Die Empfindlichkeit wurde durch die 'semi-nested' PCR erhöht. Bei 213 Proben, die im ersten PCR-Durchlauf noch als negativ erschienen, zeigte sich in der zweiten PCR, der 'semi-nested' PCR (Sekundärampifikation) die Anwesenheit von Borrelien-DNA mit einer erwarteten Fragmentgröße von 798 bis 807 bp (Abb. 6.3.1). Wie aus der Abbildung ersichtlich, erkennt man bei den Proben 132, 134, 138 und 139 erst nach der Sekundärampifikation ('semi-nested' PCR) eine positive Bande.

Ergebnisse

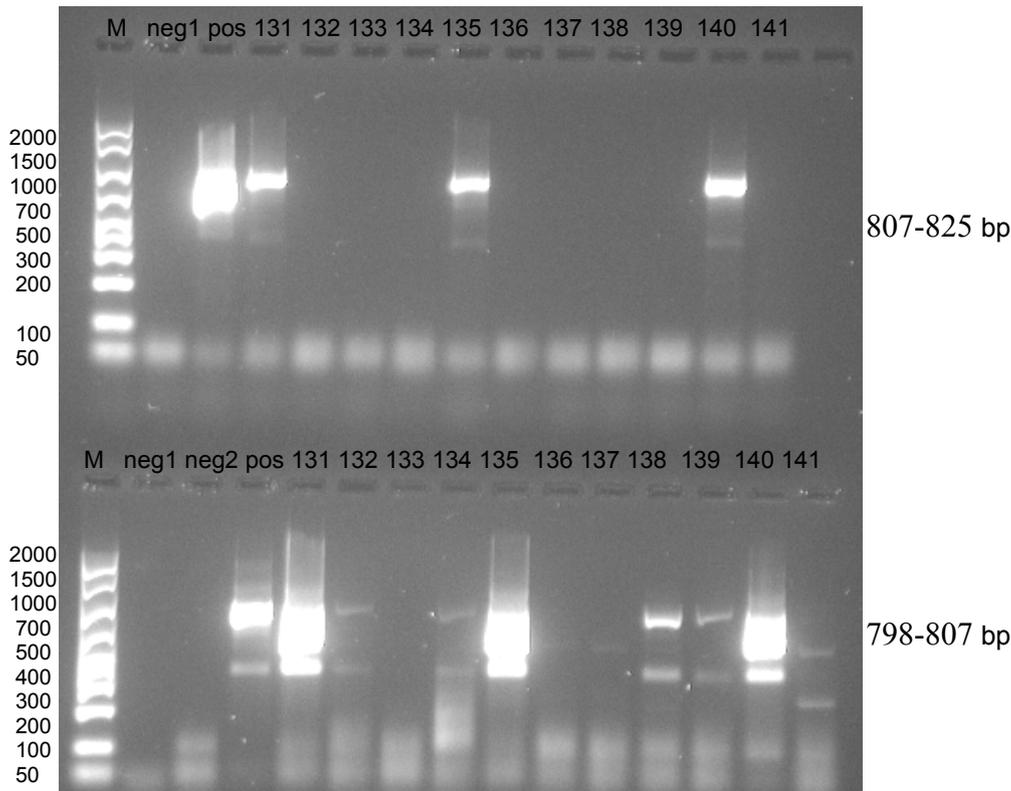


Abb. 6.3.1 Borrelien Primärampifikation und Sekundärampifikation

In diesem Agarosegel wird die Erhöhung der Sensitivität durch die Sekundärampifikation ('semi-nested' PCR) deutlich. Es sind die DNA-Amplifikate der Proben 131-141 aufgetragen. Im oberen Bild ist die Primärampifikation sichtbar, im Unteren die 'semi-nested' PCR. Als 'M' wird der verwendete Marker (DNA Ampli-Size-Molecular-Ruler) bezeichnet, als 'neg1' die Negativ-Master Mix Kontrolle der 1. PCR, wobei in der 2. PCR noch eine weitere Negativprobe ('neg2') hinzu kam. Die Proben 131, 135 und 140 zeigten bereits in der Primärampifikation eine positive Bande in der entsprechenden Höhe und wurden deshalb in der zweiten PCR sehr stark amplifiziert. Die Proben 132, 134, 138 und 139 waren hingegen erst in der 'semi-nested PCR' als positiv erkennbar. Banden in Höhe von 50 bp stellen unverbrauchte Primerdimere dar.

6.3.2 Borrelien-Typisierung durch RFLP-Analyse des *ospA*-Gens

Die RFLP-Methode, basierend auf dem *ospA*-Gen, modifiziert nach Michel und Mitarbeitern (Michel et al. 2004), wurde als Referenzmethode für die Auswertung und Subtypenbestimmung festgelegt. Da die verwendeten Restriktionsenzyme (*SspI*, *SfuI*, *BglII*, *HindIII* und *Kpn2I*) individuelle Schnittstellen im *ospA*-Gen aufweisen, entsteht für die einzelnen Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Komplexes ein jeweils charakteristisches RFLP-

Ergebnisse

Bandenmuster. Die Spezies *B. garinii* zeigt entsprechend ihrer Heterogenität im *ospA*-Gen, ein heterogenes Schnittmuster, wobei fünf der sechs verschiedenen *OspA*-Subtypen ein eigenes Schnittbild zugeordnet werden kann (Michel et al. 2004). Es gibt je nach Spezies Unterschiede in den Fragmentgrößen. Siehe Tabelle (Tab. 4.10) im Methodenteil Seite 36 (Kapitel 4.6.1). Die resultierenden Bandenmuster (Variation in Fragmentgröße und -anzahl je nach Spezies) sind in den Abbildungen (Abb. 6.3.2, Abb. 6.3.3 und Abb. 6.3.4) zu sehen.

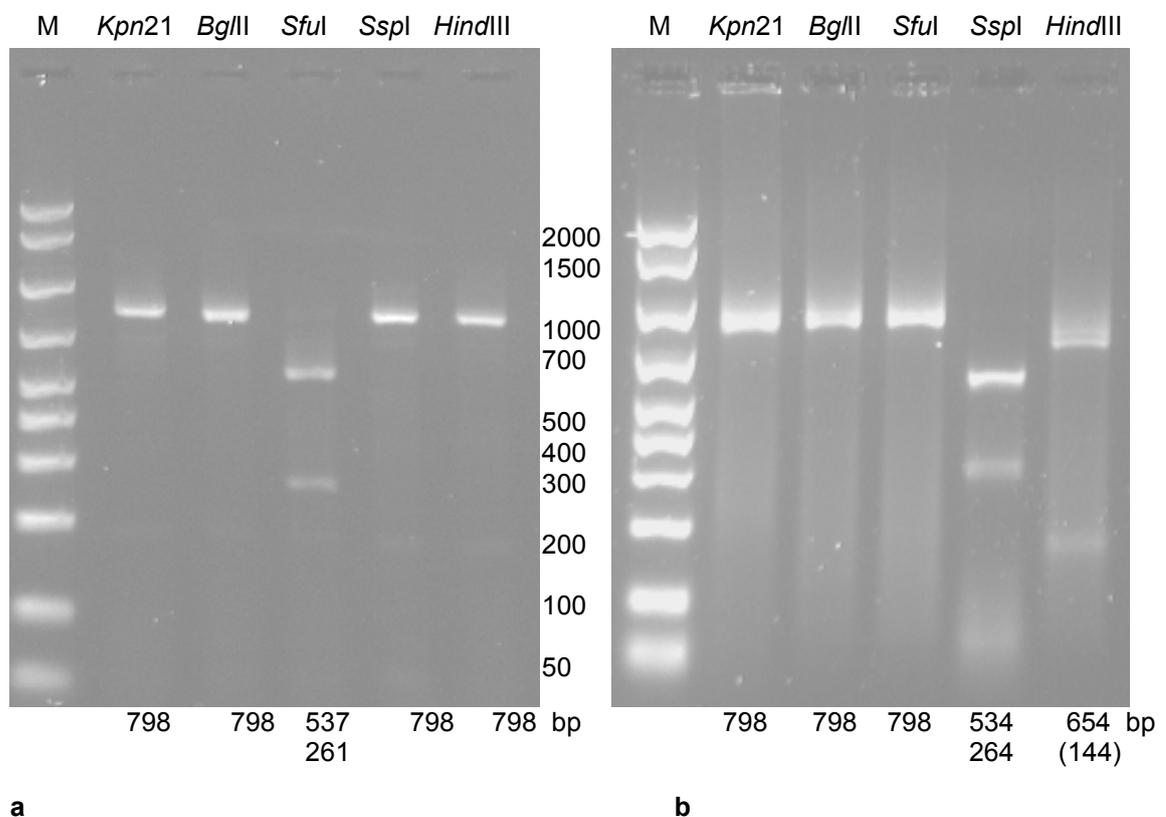


Abb. 6.3.2 RFLP *B. afzelii* und *B. burgdorferi sensu stricto*

(a) Die Spezies *B. afzelii* ist mit ihrem typischen Restriktionsmuster erkennbar. Das Restriktionsenzym *SfuI* hat das 798 bp große Fragment in 2 Banden (537 bp und 261 bp) geschnitten.

(b) *B. burgdorferi sensu stricto* ist anhand des RFLP-Musters abgebildet. Der Schnitt erfolgte durch das Enzym *SspI*.

Als 'M' wurde der DNA-Marker (50-2000 bp) bezeichnet.

Ergebnisse

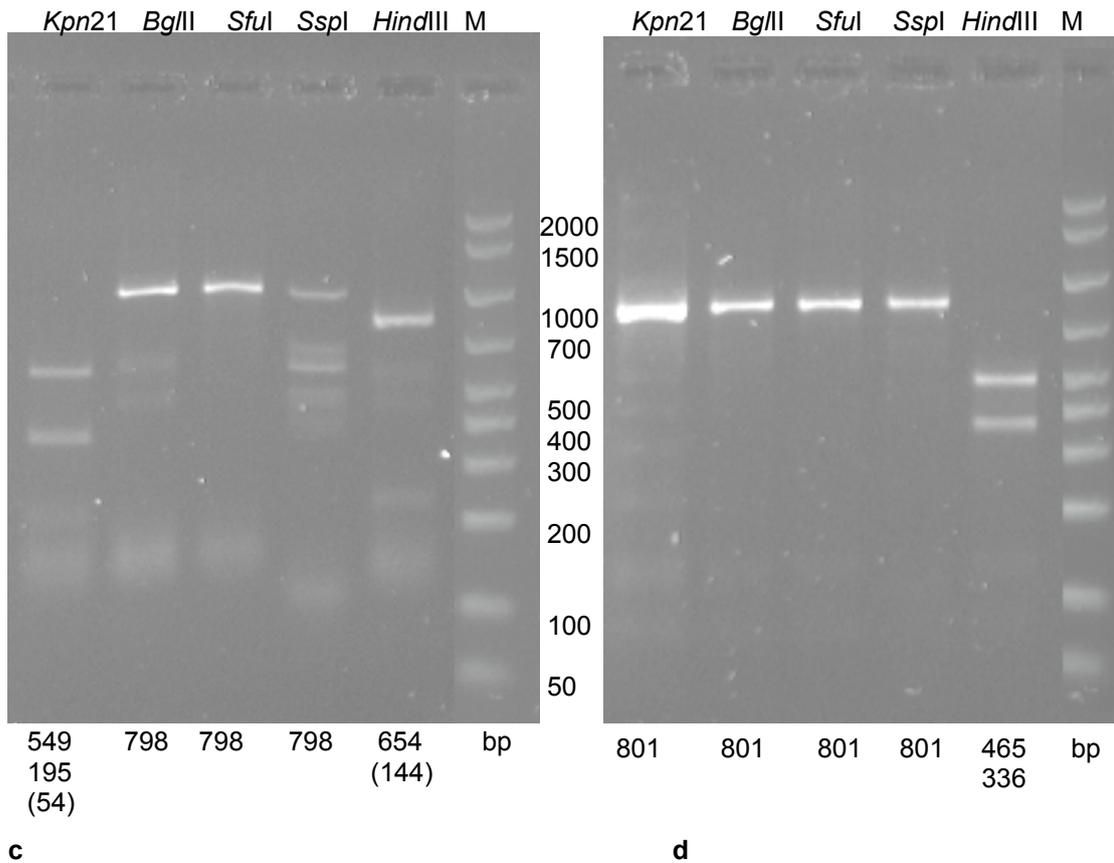
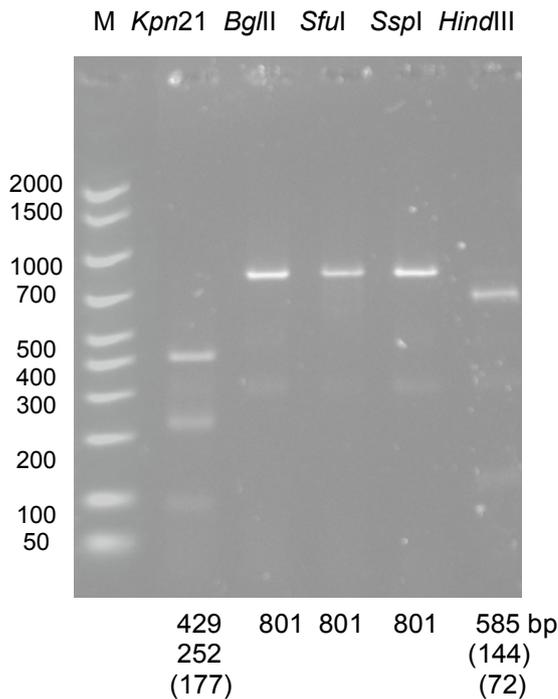


Abb. 6.3.3 RFLP *B. garinii* OspA Typ 5 und *B. valaisiana*

(c) Der Subtyp *B. garinii* OspA Typ 5 ist erkennbar. Das RFLP-Muster weist Schnittstellen nach Verdau mit den Enzymen *Kpn21* und *HindIII* auf.

(d) *B. valaisiana* „subgroup I“ ist 801 bp lang und wird nur durch das Enzym *HindIII* geschnitten.

Ergebnisse



e

Abb. 6.3.4 RFLP *B. garinii* OspA Typ 6

In diesem Bild ist das RFLP-Muster von *B. garinii* OspA Typ 6 bzw. OspA Typ 8 im Agarosegel veranschaulicht. Erkennbar ist der Schnitt durch die Enzyme *Kpn2I* und *HindIII*. Differenzieren lassen sich diese Serotypen durch den Verdau mit *XbaI*. Serotyp 6 wird dabei in die folgenden 3 Fragmente gespalten: 606/122/73 bp, der Serotyp 8 nur in zwei: 725/76 bp.

Das RFLP-Muster von *B. garinii* OspA Typ 6 ist nicht typisch für diesen Serotyp, denn auch der Serotyp 8 weist dieses Schnittbildmuster auf, wie bereits von Lencakova und Mitarbeitern (Lencakova et al. 2006) beschrieben. Aus diesem Grund wurde ein Verdau mit dem Enzym *XbaI* bei allen Proben, die dieses RFLP-Muster aufwiesen, angeschlossen. Dabei entstehen für *B. garinii* Typ 6 folgende Fragmente: 606/122/73 und für den Serotyp 8: 725 und 76 bp.

In zwei Proben konnte *B. valaisiana* „subgroup II“ und in 3 der Stamm A14S nachgewiesen werden. Auch zur Differenzierung dieser Subtypen wurde bei diesen Proben der Verdau mit dem Enzym *XbaI* durchgeführt. Der Stamm A14S wird dabei nicht geschnitten. Die *B. valaisiana* „subgroup II“ wird in zwei Fragmente gespalten: 556/242 bp.

Ergebnisse

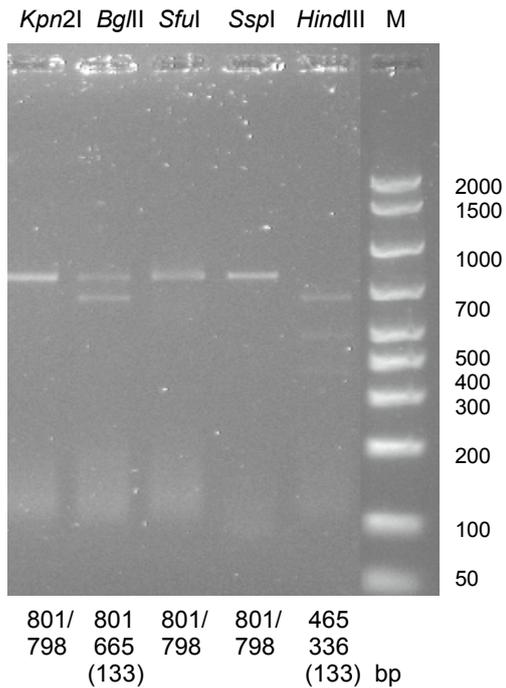


Abb. 6.3.5 *B. valaisiana* „subgroup I“/A14S Mischinfektion

B. spielmanii wird durch *XbaI* nicht geschnitten, *B. valaisiana* „subgroup II“ wird in 2 Fragmente gespalten.

Die Spezies *B. lusitanae* konnte nur in einer einzelnen Zecke nachgewiesen werden, deswegen wurde auf die Abbildung des RFLP-Musters verzichtet.

6.3.3 Borrelien-Sequenzierung

Zwanzig Proben konnten nach dem Restriktionsverdau nicht eindeutig einer Spezies zugeordnet werden und wurden daher sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit denen der NCBI-Datenbank verglichen, wobei 5 Isolate als *B. garinii* und 3 als *B. valaisiana* identifiziert wurden. Fünf Borrelien-Sequenzen konnten keinem Subtyp zugeordnet, aber als *B. burgdorferi* sensu lato gekennzeichnet werden. In der Sequenzierung waren 7 Proben negativ.

6.4 Doppelinfektionen Borrelien

Anhand der Bandenmuster des RFLP konnten auch Mehrfachinfektionen in einer Zecke ermittelt werden. Die Restriktionsmuster von Infektionen mit mehr als einer Borrelien-Spezies entsprechen einer Kombination aus den charakteristischen RFLP-Einzelbildern (Abb. 6.4.1, Abb. 6.4.2).

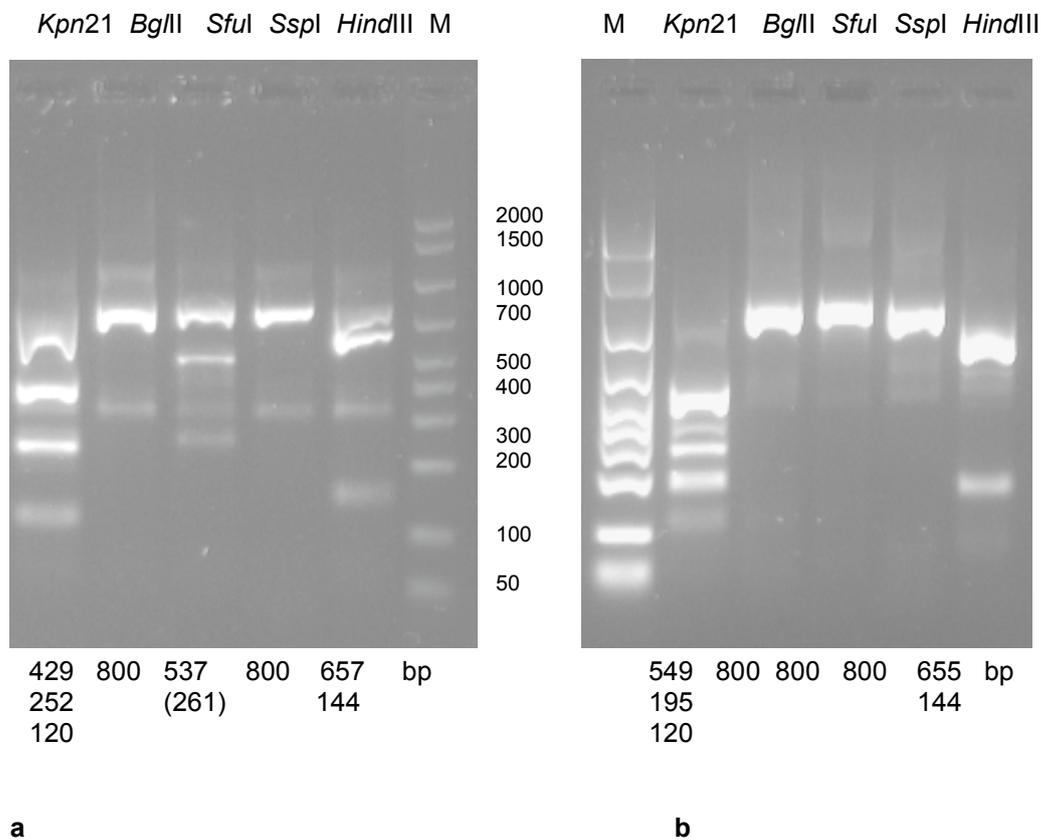


Abb. 6.4.1 Borrelien: RFLP Doppelinfektionen (a, b)

(a) Eine Doppelinfektion mit *B. garinii* OspA Typ 6 und *B. afzelii* ist erkennbar.

(b) Abgebildet ist das RFLP-Muster einer Doppelinfektion mit *B. garinii* OspA Typ 6 und OspA Typ 5. Die Restriktionsmuster entsprechen einer Kombination aus den charakteristischen Einzelbildern.

Ergebnisse

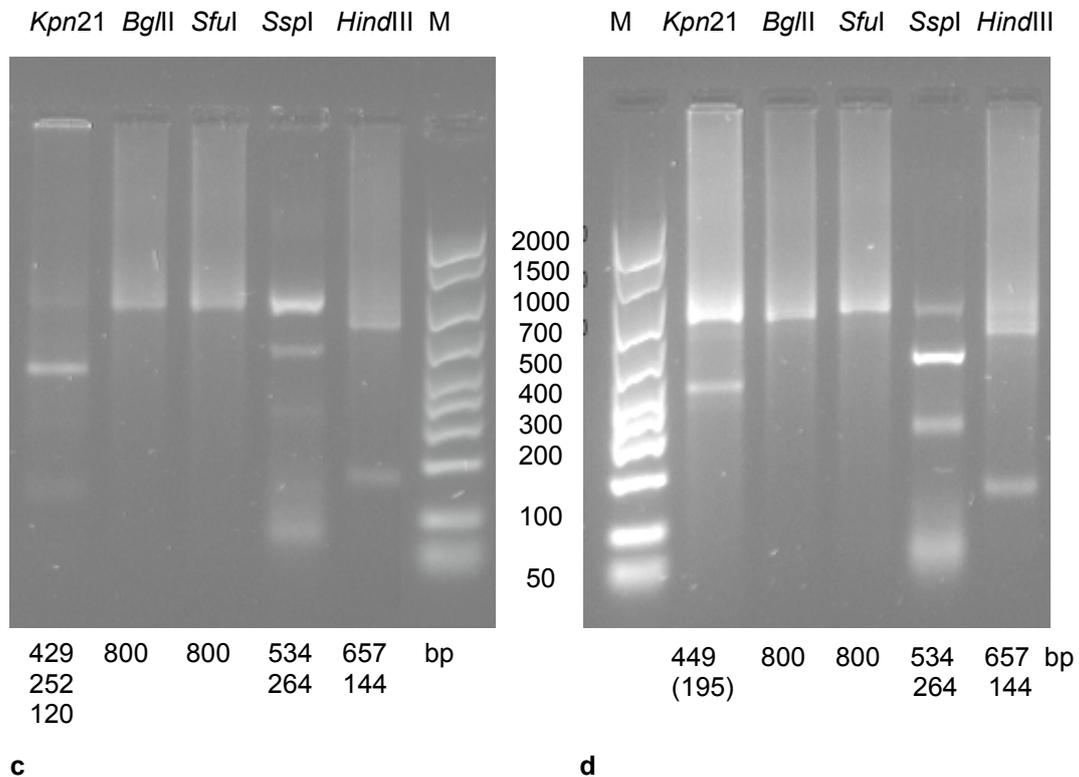


Abb. 6.4.2 Borrelien: RFLP Doppelinfektionen (c, d)

(c) Links im Bild ist eine Doppelinfektion mit *B. garinii* OspA Typ 6 und *B. burgdorferi* s.s. zu erkennen. (b) Hier ist *B. garinii* OspA Typ 5 und *B. burgdorferi* sensu stricto in einer Doppelinfektion dargestellt.

Insgesamt konnten in 14 nüchternen *I. ricinus* Zecken (1,4%) Doppelinfektionen mit zwei Subtypen des *BbsI*-Komplex nachgewiesen werden. *B. garinii* dominierte in Kombinationen mit *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* und *B. afzelii* (Tab. 6.2). Eine Zecke war mit *B. afzelii* und *B. valaisiana* infiziert.

Ergebnisse

<i>B.b.s.l.</i> Subtyp	<i>B.b.s.l.</i> Subtyp	Entwicklungsstadium	Sammeldatum
<i>B. valaisiana</i>	<i>B. afzelii</i>	Nymphe	01.08.2006
<i>B. garinii</i> Typ 3	<i>B. valaisiana</i>	Nymphe	14.06.2006
<i>B. garinii</i> Typ 4	<i>B. valaisiana</i> subgroup II	Weibchen	01.05.2007
<i>B. garinii</i> Typ 5	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Weibchen	03.07.2006
<i>B. garinii</i> Typ 5	<i>B. valaisiana</i>	Nymphe	03.07.2006
<i>B. garinii</i> Typ 6	<i>B. afzelii</i>	Nymphe	01.09.2006
<i>B. garinii</i> Typ 6	<i>B. afzelii</i>	Nymphe	01.04.2007
<i>B. garinii</i> Typ 6	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Nymphe	01.09.2006
<i>B. garinii</i> Typ 6	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Weibchen	01.05.2007
<i>B. garinii</i> Typ 6	<i>B. garinii</i> Typ 5	Männchen	01.05.2007
<i>B. garinii</i>	<i>B. afzelii</i>	Männchen	10.05.2006
<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Nymphe	10.05.2006
<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Nymphe	01.06.2007
<i>B. garinii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Weibchen	01.06.2007

Tab. 6.2 Übersicht: Zecken mit Borrelien-Doppelinfektionen

In den 14 doppelt infizierten Zecken konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Adulten und Nymphen oder zwischen den einzelnen Monaten festgestellt werden. Die Verteilung kann der Tabelle entnommen werden. Es waren 0,8% der untersuchten Nymphen doppelt infiziert und 0,6% Adulte.

6.5 Babesienuntersuchungen

6.5.1 Ergebnisse der Babesien-PCR

Zur Detektion der Babesien wurde ein 284 bp großes Fragment des 18S-rRNA-Gens mit Hilfe der Primer Bab 18S fw und Bab 18S rev amplifiziert (Abb. 6.5.1). Der Großteil der 1000 untersuchten Proben konnte so als positiv oder negativ differenziert werden. Von den positiven Proben wurden nachfolgend mehrere molekularbiologische Verfahren zur Bestätigung durchgeführt, unter anderem ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI* und die anschließende Sequenzierung zur Speziestypisierung. Etwa 115 Proben konnten nach der PCR nur als fraglich positiv bezeichnet werden, von denen 7 Proben mit einer zweiten PCR über die Amplifizierung eines anderen 582 bp großen Abschnitts des 18S-rRNA-Gens mit dem Primerpaar Bab 18S F3/18S R3 und nachfolgender Sequenzierung als positiv bestätigt wurden. Insgesamt konnten bei 5,0% der Proben (50 von 1000) Infektionen mit *Babesia microti* oder *B. divergens* nachgewiesen werden.

Ergebnisse

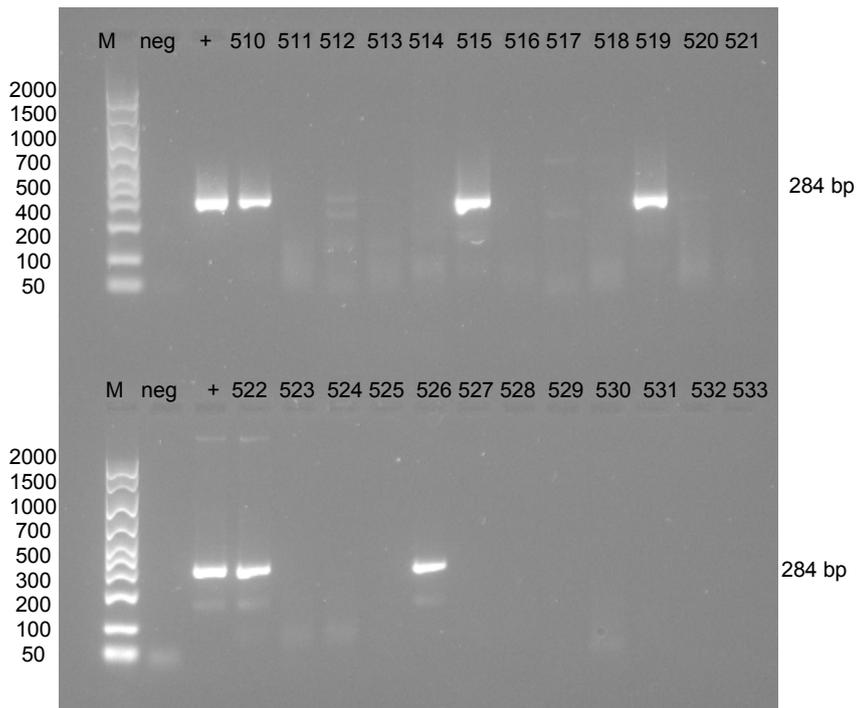


Abb. 6.5.1 Babesien PCR-284 bp großes Amplifikat

Die Abbildung 6.5.1 dient zur Veranschaulichung der Babesien-PCR Ergebnisse. Es wurden die Amplifikate 510 bis 533 der Babesien-PCR in ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Die Proben 510, 515, 522 und 526 sind als positive Banden in der erwarteten Höhe von 284 bp erkennbar.

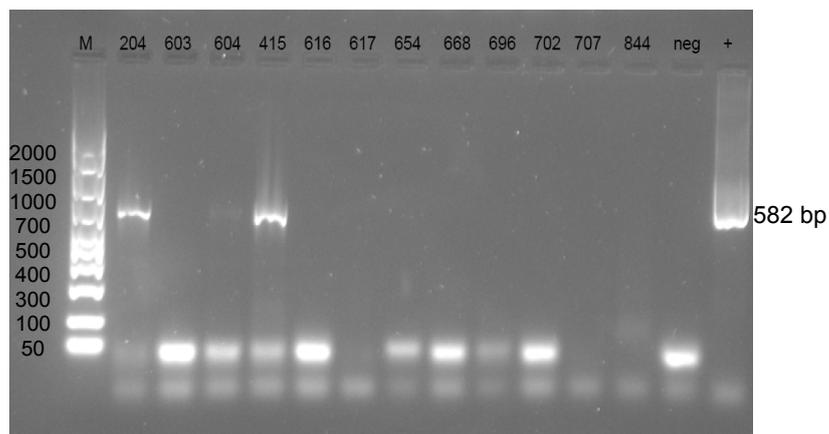


Abb. 6.5.2 Babesien PCR-582 bp großes Amplifikat

Im Agarosegel ist die PCR-Amplifikation des 582 bp großen Fragmentes des 18S-rRNA-Gens von *Babesia* spp. dargestellt. Deutlich werden die positiven Proben 204 und 415. Banden in der Höhe von 50 bp und darunter stellen Primerdimere dar.

6.5.2 Babesien: Speziesidentifizierung durch Restriktionsverdau

Die PCR des 284 bp grossen Fragmentes war sehr sensitiv, allerdings zeigten sich in der Gelelektrophorese häufig unspezifische Banden, die großzügig als positiv bewertet und anschließend mit in den Restriktionverdau einbezogen wurden. Aus diesem Grund waren v.a. die in der PCR fraglich positiven Proben in der Restriktionsanalyse negativ. Es wurden 115 dieser fraglichen Proben zur Sicherheit einer zweiten PCR eines anderen Abschnitts des 18S-rRNA-Gens überführt, um eine Mutation des Restriktionsortes auszuschließen.

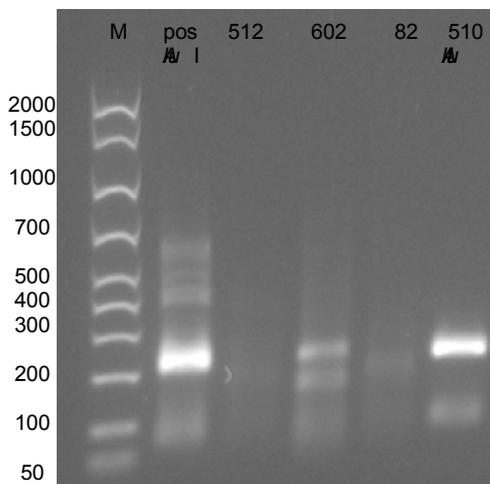


Abb. 6.5.2 Babesien: Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI*

In diesem Agarosebild ist der Restriktionsverdau mit dem Enzym *AluI* sichtbar. Die Probe 510 konnte als positiv bestätigt werden.

6.5.3 Speziesdifferenzierung

Die Speziesdifferenzierung erfolgte anhand Sequenzierung der nach PCR-Amplifikation und Restriktion oder nach zweiter PCR als positiv bezeichneten Proben. Die Sequenzanalyse ergab bei 28 Proben eine 97-100%-ige Homologie mit dem *Babesia microti* Isolat der NCBI-Datenbank (Accession No: AF093840), bei 20 Proben mit *Babesia divergens* (Accession No: AY44688). Zwei Proben konnten nur als *Babesia* spp. analysiert werden. Durch die Sequenzierung konnte bei einer Probe (Zecke 515 fw) eine 99%-ige Übereinstimmung zur Sequenz der Babesien der Patientin aus Jena/Thüringen gefunden werden, bei der erstmals eine autochthone *Babesia microti*-Infektion in Europa beschrieben wurde (Abb. 7.5.1 im Anhang auf Seite 114).

6.6 Überblick Prävalenzen

Dieses Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die Prävalenzen der mit Borrelien oder Babesien infizierten nüchternen, aus dem Zeitgrund/Stadtroda gesammelten *Ixodes ricinus* Zecken (Abb. 6.6.1).

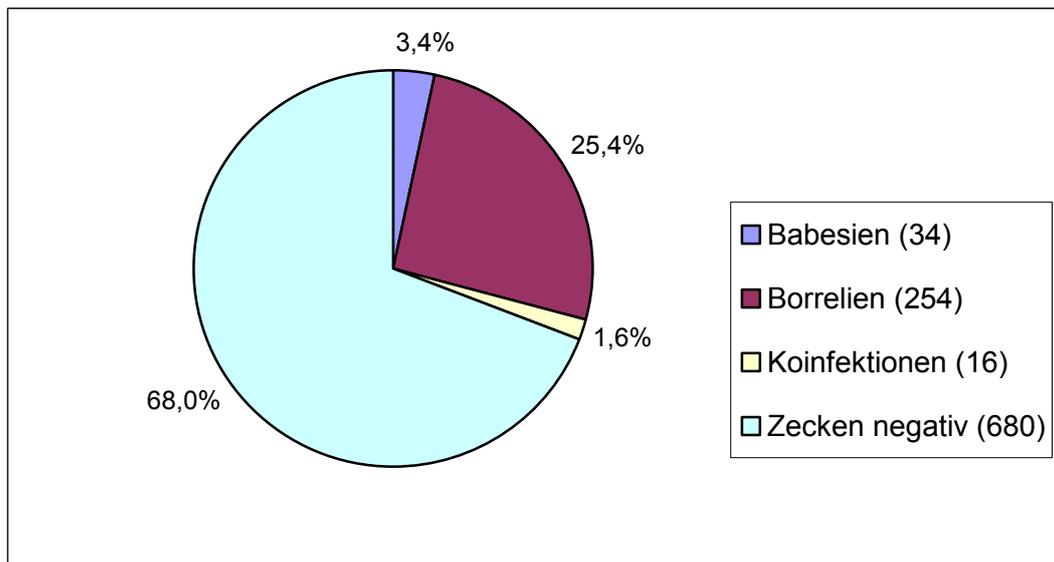


Abb. 6.6.1 Kreisdiagramm: Anteil Borrelien, Babesien und Koinfektionen

Dargestellt sind die anteilmäßigen Gesamtinfektionsraten der *I. ricinus* Zecken aus dieser Studie. Die meisten Zecken sind mit Borrelien des Bbsl- Komplexes infiziert.

Borrelia spp. Infektionen: 25,4% (254) + 1,6% (16) koinfiziert mit *Babesia* spp. = 27,0% (270)

Babesia spp. Infektionen: 3,4% (34) + 1,6% (16) koinfiziert mit *Borrelia* spp. = 5,0% (50)

Von den 1000 untersuchten *Ixodes ricinus* Zecken waren 27,0% (270/1000) mit *Borrelia burgdorferi* s.l., 5,0% (50/1000) mit *Babesia* spp. infiziert und in 1,6% (16/1000) der Zecken traten Koinfektionen mit beiden Erregern auf. Diese Infektionsraten wurden auch getrennt nach den einzelnen Sammeljahren aufgeschlüsselt. Somit ergeben sich für *Borrelia burgdorferi* s.l. folgende Prävalenzen: 2006: 27,1% (137/506), 2007: 26,9% (133/494). *Babesia* spp. waren im Jahr 2006 mit 7,9% (40/506) vertreten, im Jahre 2007 allerdings nur mit 2,0% (10/494). Die einzelnen Infektionszahlen der entsprechenden Sammelmonate sind aus der Abbildung (Abb. 6.6.2) abzulesen.

Ergebnisse

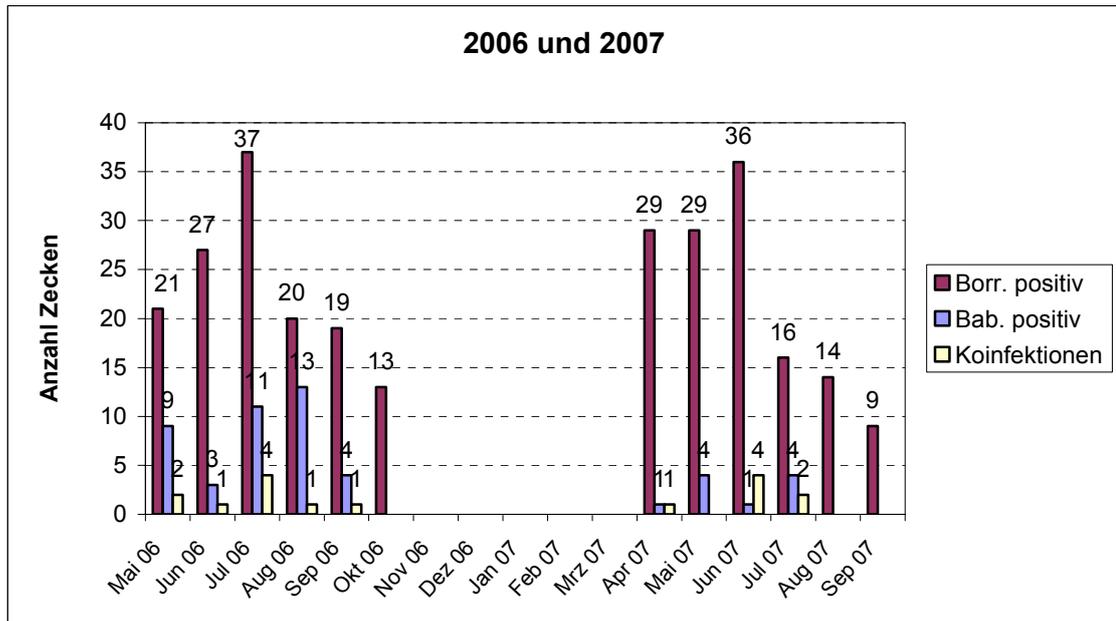


Abb. 6.6.2 Überblick Infektionszahlen

Im Diagramm 6.6.2 sind die monatlichen Infektionszahlen der 506 untersuchten Zecken aus dem Jahr 2006 und der 494 Zecken aus dem Jahr 2007 abgebildet. Man erkennt, dass der Hauptanteil der Infektionen durch Borrelien verursacht wird. Auffällig ist der Peak im Juli 2006 bei beiden Erregern. Im zweiten Jahr waren nur 10 Zecken mit Babesien infiziert. Der 'Borrelienpeak' ist in diesem Jahr schon im Juni erkennbar, wobei die Prävalenzen bereits zu Beginn der Fangsaison hoch waren. Bei dieser Darstellung sind die 9 koinfizierten Zecken aus 2006 und die 7 Koinfektionen aus 2007 sowohl bei den Borrelien-positiven als auch den Babesien-positiven Zahlen enthalten. Von Nov. 2006 bis März 2007 war aufgrund der Witterung und Zeckeninaktivität Sammelpause.

Die Studiengestaltung erlaubte auch eine Auswertung der Prävalenzen nach den entsprechenden *Ixodes ricinus*-Entwicklungsstadien (Abb. 6.6.3, Abb. 6.6.4). Für adulte Zecken konnten höhere Infektionsraten ermittelt werden. 32,3% (184/570) der adulten Zecken waren mit *Borrelia burgdorferi* s.l. und 7,4% (42/570) mit *Babesia* spp. infiziert. Für die Nymphen ergaben sich niedrigere Prävalenzen, für *Borrelia burgdorferi* s.l. 20,0% (86/430) und für *Babesia* spp. 1,9% (8/430). Die entsprechenden Infektionszahlen der einzelnen Jahre können für jedes Zeckenentwicklungsstadium aus den folgenden Abbildungen (Abb. 6.6.3, Abb. 6.6.4) entnommen werden.

Ergebnisse

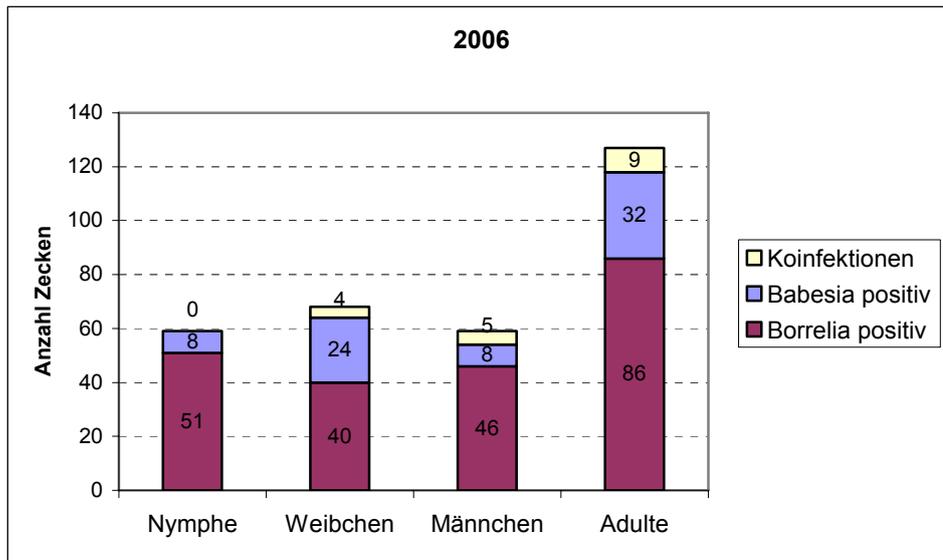


Abb. 6.6.3 Infektionszahlen nach Entwicklungsstadium 2006

Im Diagramm 6.6.3 sind die Prävalenzen nach den unterschiedlichen *Ixodes ricinus*-Entwicklungsstadien aufgeschlüsselt. Die adulten Zecken weisen deutlich häufiger Infektionen sowohl mit Borrelien als auch mit Babesien auf. Keine der Nymphen ist mit beiden Erregern koinfiziert.

Auffällig ist, dass es im Jahr 2006 keine Koinfektion mit beiden Erregern bei den Nymphen gibt und im Jahr 2007 weisen Nymphen nur Infektionen mit Borrelien auf. Mit Babesien sind die Weibchen am häufigsten infiziert. Bei den Borrelien sind die Infektionsraten auf alle drei Entwicklungsstadien annähernd gleich verteilt.

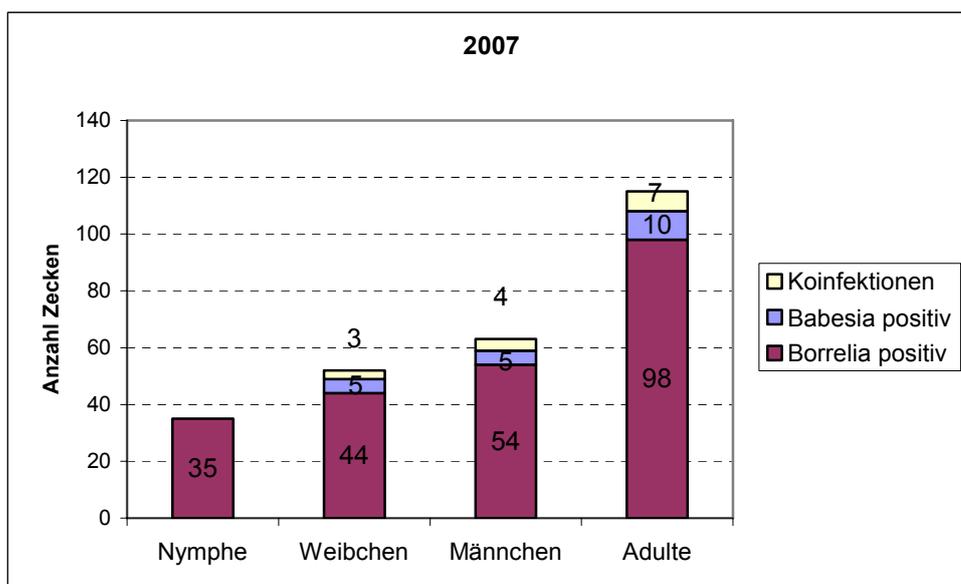


Abb. 6.6.4 Infektionszahlen nach Entwicklungsstadium 2007

Ergebnisse

Aufschlüsselung der Prävalenzen für das Jahr 2007 nach *Ixodes ricinus*-Entwicklungsstadien. Auch im Jahr 2007 sind deutlich mehr adulte Zecken mit beiden Erregern infiziert. Auffällig ist, dass wiederum keine Nymphe koinfiziert ist. Die gesammelten Nymphen wiesen in diesem Jahr auch keine Infektion mit Babesien auf. Allerdings kann dieser Sachverhalt auch auf die in diesem Jahr allgemein niedrige Prävalenz mit Babesien zurückzuführen sein.

6.7 Borrelien-Prävalenzen

6.7.1 Infektionsraten

Es konnte im Naherholungsgebiet Zeitgrund/Stadtroda eine Gesamtinfektionsrate für Borrelien von 27,0% (270/1000) ermittelt werden. Die adulten Zecken waren mit 32,3% (184/570) insgesamt hochsignifikant häufiger (Chi-Quadrat-Test $p < 0,0001$) infiziert als die Nymphen 20,0% (86/430) (Tab. 6.3).

Borrelien * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			Negativ	positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	386	184	570
		% von Sex	67,7%	32,3%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-1,5	2,4	
	Nymphen	Anzahl	344	86	430
		% von Sex	80,0%	20,0%	100,0%
		Standardisierte Residuen	1,7	-2,8	
Gesamt	Anzahl	730	270	1000	
	% von Sex	73,0%	27,0%	100,0%	

Tab. 6.3 Borrelien: Ergebnis Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

In den einzelnen Jahren 2006 und 2007 ergaben sich leicht differierende Gesamtprävalenzen. Im Jahr 2006 betrug die Borrelieninfektionsrate 27,1% (137/506) und im Jahr 2007 26,9% (133/494) wie man den Tabellen (Tab. 6.4, Tab. 6.6) entnehmen kann.

Ergebnisse

2006	Anzahl	positiv	Quote	positive	positive	positive
				Männchen	Nymphen	Weibchen
				2006	2006	2006
Mai	86	21	24,42%	9	4	8
Juni	87	27	31,03%	6	12	9
Juli	87	37	42,53%	17	10	10
August	94	20	21,28%	9	8	3
Septemb.	87	19	21,84%	3	6	10
Oktober	65	13	20,00%	2	11	0
Total	506	137	27,08%	46	51	40

Tab. 6.4 Borrelienprävalenzen 2006

In dieser Tabelle sind die Prävalenzen des Jahres 2006 entsprechend der gesammelten Monate und Entwicklungsstadien aufgeschlüsselt.

Für das Jahr 2006 konnten nicht signifikant häufiger Infektionen in adulten Zecken im Vergleich zu Nymphen nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test $p=0,331$, $p>0,05$, $p>\alpha$).

Borrelien 2006 * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			Negativ	positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	214	86	300
		% von Sex	71,3%	28,7%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-,3	,5	
	Nymphen	Anzahl	155	51	206
		% von Sex	75,2%	24,8%	100,0%
		Standardisierte Residuen	,4	-,6	
Gesamt	Anzahl	369	137	506	
	% von Sex	72,9%	27,1%	100,0%	

Tab. 6.5 Borrelien: Ergebnis 2006 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

Ergebnisse

2007	Anzahl	Positiv	Quote	positive	positive	positive
				Männchen	Nymphen	Weibchen
				2007	2007	2007
April	80	29	36,25%	11	8	10
Mai	84	29	34,52%	15	4	10
Juni	84	36	42,86%	16	9	11
Juli	79	16	20,25%	6	3	7
August	105	14	13,33%	4	5	5
Septemb.	62	9	14,52%	2	6	1
Total	494	133	26,92%	54	35	44

Tab. 6.6 Borrelienprävalenzen 2007

In der Tabelle sind die Borrelienprävalenzen für das Jahr 2007 nach gesammelten Monaten und Entwicklungsstadien verdeutlicht.

Im Untersuchungsjahr 2007 sind nach dem Chi-Quadrat-Test adulte Zecken 36,3% (98/270) hochsignifikant häufiger infiziert als Nymphen 15,6% (35/224) (Chi-Quadrat-Test $p < 0,0001$).

Borrelien 2007 * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			negativ	positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	172	98	270
		% von Sex	63,7%	36,3%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-1,8	3,0	
	Nymphen	Anzahl	189	35	224
		% von Sex	84,4%	15,6%	100,0%
		Standardisierte Residuen	2,0	-3,3	
Gesamt	Anzahl	361	133	494	
	% von Sex	73,1%	26,9%	100,0%	

Tab. 6.7 Borrelien: Ergebnis 2007 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

6.7.2 Entwicklungsstadien

Bei genauer Betrachtung der Tabellen (Tab. 6.4 und Tab. 6.6) erkennt man, dass die Infektionsraten der einzelnen Entwicklungsstadien variieren. Dieser Sachverhalt lässt sich mit Hilfe des Entwicklungszyklus der *Ixodes ricinus* Zecke erklären, denn für jede Metamorphose in ein neues Entwicklungsstadium ist eine Blutmahlzeit Voraussetzung und somit eine erhöhte Infektionsgefahr gegeben. Transovarielle Infektionen scheinen eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Männchen sind in den Infektionen etwas häufiger vertreten als Nymphen und Weibchen (Abb. 6.7.1, Abb. 6.7.2). Auch in den Monaten mit den höchsten Infektionsraten dominieren die Männchen. So konnte dieser Zusammenhang für den Monat Juli 2006 (Abb. 6.7.1 *) als signifikant belegt werden (Chi-Quadrat-Test $p=0,033$ und $p=0,019$, $p<0,05$). In allen anderen Monaten war dieser Unterschied nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test $p<0,05$).

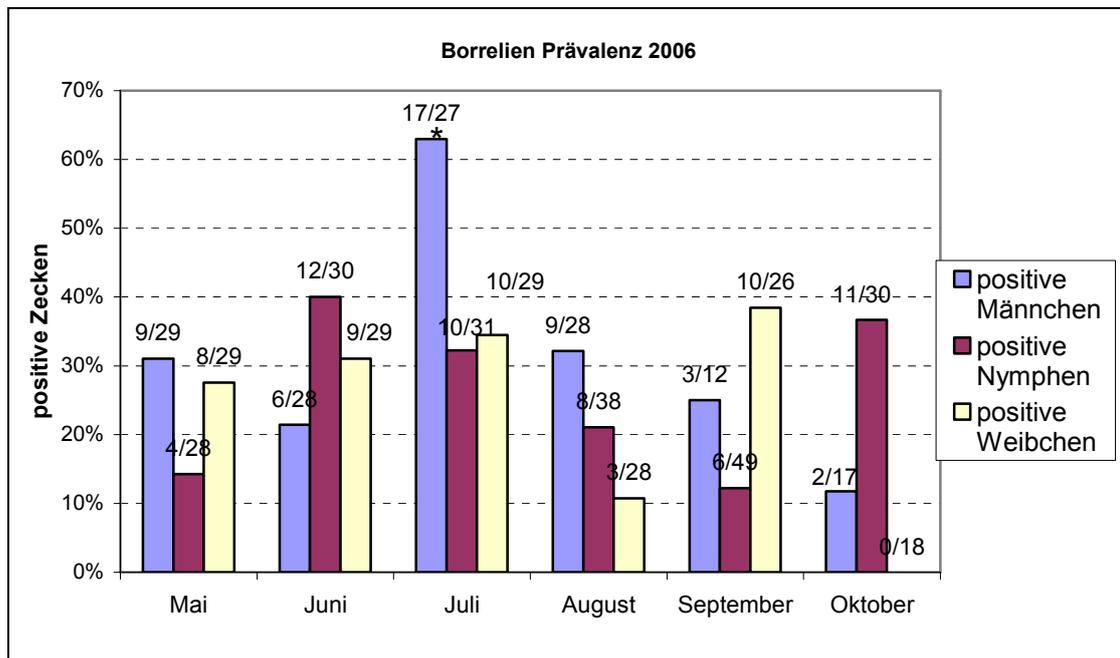


Abb. 6.7.1 Borrelien Prävalenz 2006 nach Entwicklungsstadien

Dargestellt sind die monatlichen Borrelien-Infektionsraten der gesammelten Zecken für jedes einzelne Entwicklungsstadium.

* Der Unterschied zwischen den Stadien ist für Juli nach dem Chi-Quadrat-Test signifikant.

Ergebnisse

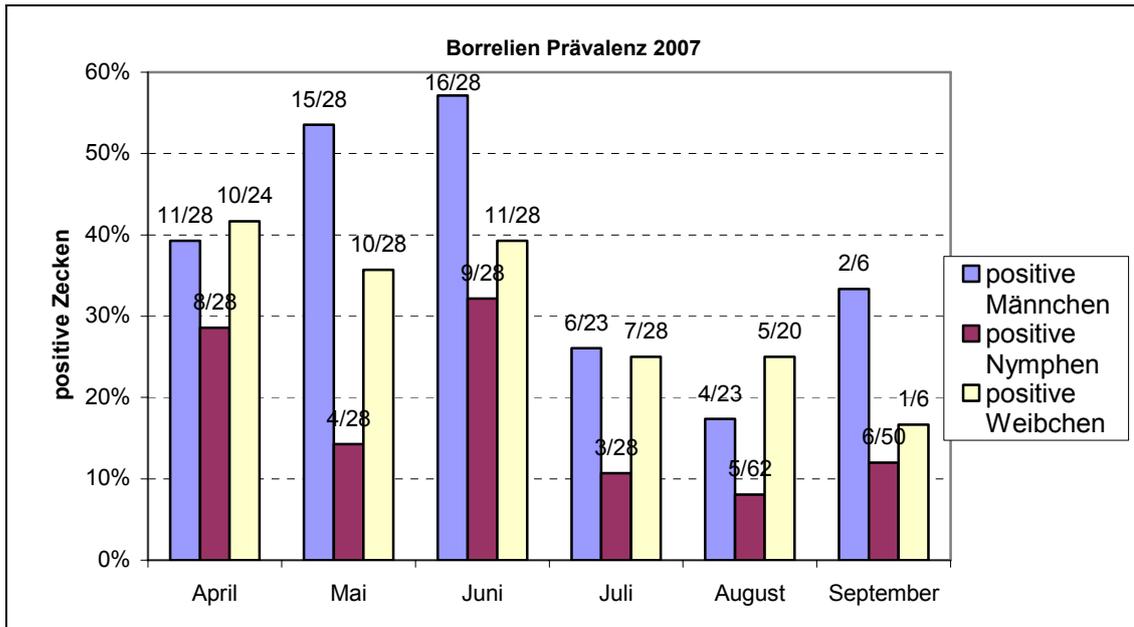


Abb. 6.7.2 Borrelien Prävalenz 2007 nach Entwicklungsstadien

Auch 2007 kann für jedes Entwicklungsstadium eine monatliche Borrelien-Infektionsrate abgelesen werden. Die Männchen sind hier in fast jedem Monat häufiger vertreten.

6.7.3 Saisonale Abhängigkeit

In der vorliegenden Studie konnte für Thüringen nur ein eingipfliger Verlauf der saisonalen Borrelienprävalenz beschrieben werden (Abb. 6.7.3). Im Jahr 2006 ist der Gipfel im Juli erkennbar im Jahr 2007 bereits im Juni. In der Literatur (Gray 1991, Kahl et al. 1992, Sonenshine 1993) wird in Europa meist von bimodalen Verlaufskurven der saisonalen Zeckenaktivität berichtet, mit zwei verschiedenen Häufigkeitsgipfeln, der erste im Frühsommer von Mai bis Juni und der zweite im Herbst von September bis Oktober.

Ergebnisse

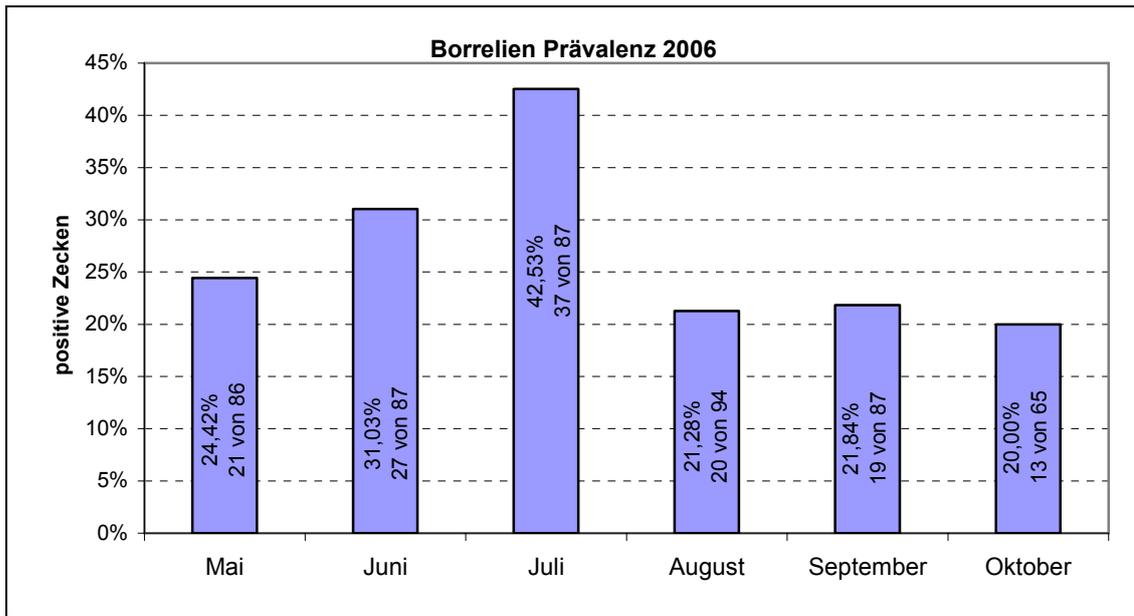


Abb. 6.7.3 Borrelien: Saisonale Prävalenz 2006

In der Abbildung 6.7.3 ist die für das Jahr 2006 monatliche Borrelien-Prävalenz abgebildet. Deutlich erkennbar ist der erste Peak im Juli.

Der Infektions-Peak im Jahr 2007 stellt sich bereits im Juni dar, wobei auffällig ist, dass bereits im April und Mai sehr hohe Infektionsraten bestehen. Eine Ursache könnte der sehr warme Winter 2006/2007 (siehe Kapitel 6.7.4) sein. Ab Juli 2007 wird ein Rückgang der Borrelienprävalenzen deutlich. Dies könnte mit den in diesem Monat durchgeführten Waldaufräumungs- und Forstarbeiten im Sammelgebiet in Zusammenhang stehen.

Ergebnisse

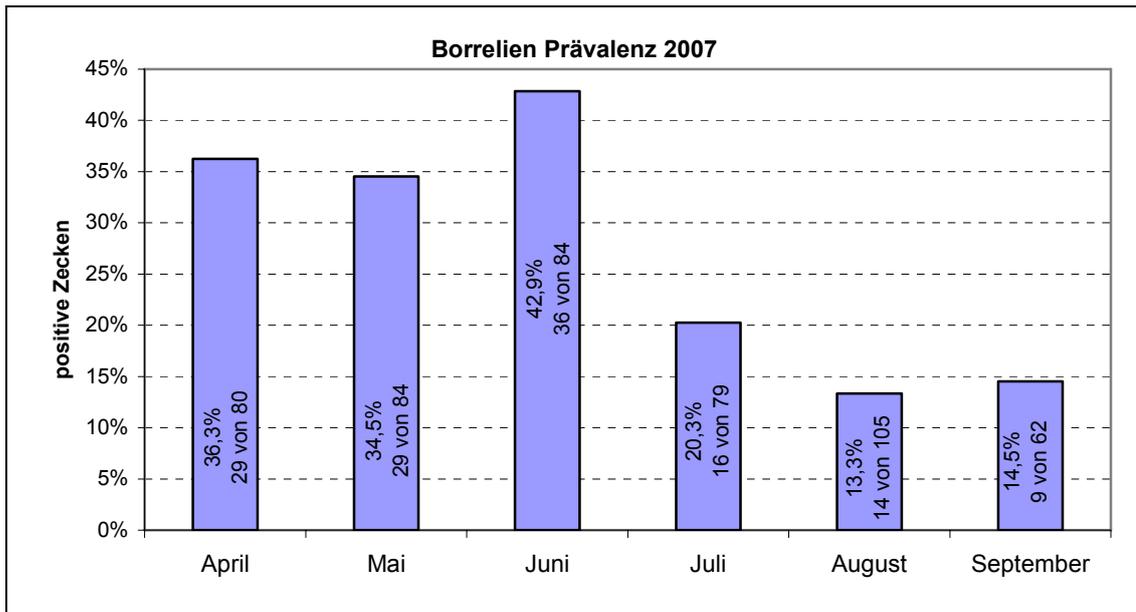


Abb. 6.7.4 Borrelien: Saisonale Prävalenz 2007

Die Darstellung verdeutlicht die monatlichen Borrelien-Prävalenzen. Die bereits zu Beginn des Jahres hohen Prävalenzen fallen auf.

6.7.4 Abhängigkeit vom Wetter

Eine Abhängigkeit der Infektionsraten von verschiedenen Wetterbedingungen wie z.B. der Lufttemperatur (Abb. 6.7.5) und relativer Luftfeuchtigkeit konnte in dieser Studie vermutet werden. Die zu Beginn des Jahres 2007 hohen Prävalenzen in den Monaten April und Mai lassen sich auf die sehr milden Temperaturen von November 2006 bis April 2007 zurückführen. In diesen Monaten lag die gemessene mittlere Lufttemperatur nie unter 5°C. Weiterhin wird aus dieser Grafik deutlich, dass sich besonders die Borrelienprävalenzen der männlichen Zecken dem Verlauf der Temperaturkurve annähern. Die Männchen (im Diagramm blau gekennzeichnet) weisen häufig die höchsten Infektionsraten auf. Auch in der Literatur wird ein Zusammenhang zwischen Zeckenaktivität und klimatischen Bedingungen beschrieben (Nilsson 1988).

Ergebnisse

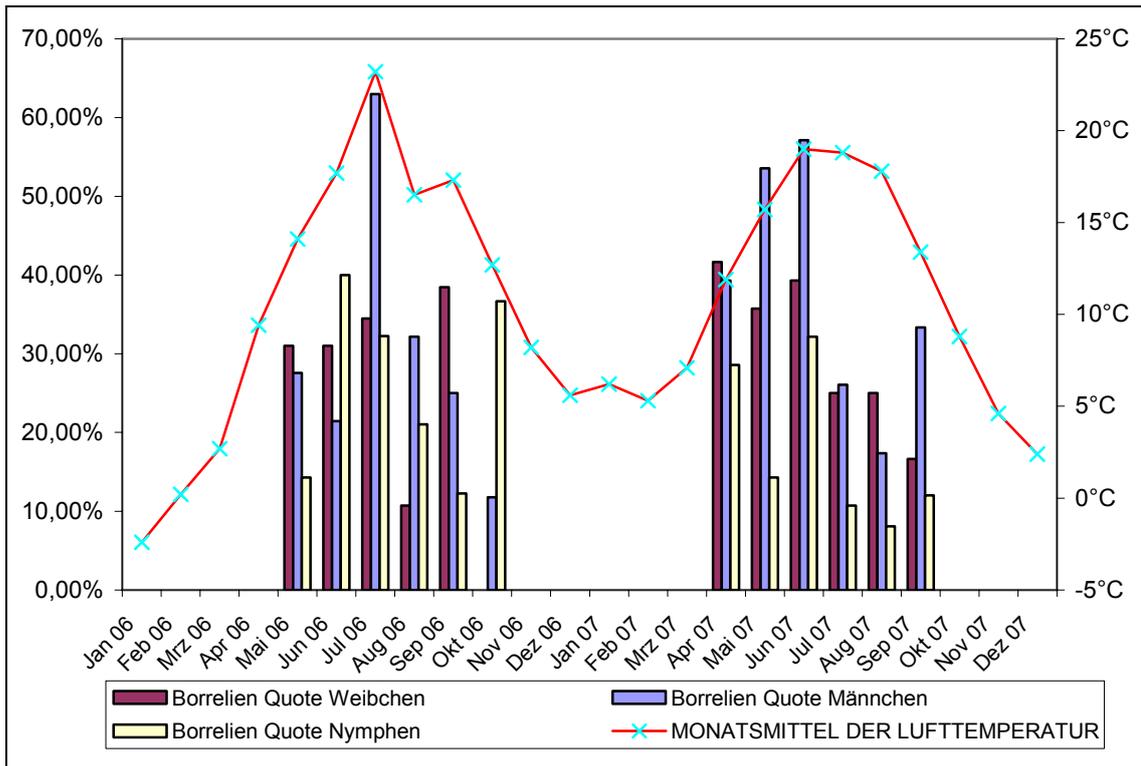


Abb. 6.7.5 Abhängigkeit der Prävalenzen vom Wetter

Ein Zusammenhang zwischen der in der Wetterstation Volkssternenwarte Jena gemessenen, mittleren Lufttemperatur in °C und der prozentualen Borreliendurchseuchungsrate in % lässt sich anhand dieser Abbildung vermuten. Eine statistische Zeitreihenanalyse lässt sich aufgrund der geringen Anzahl an Zeitpunkten allerdings nicht durchführen. Die Wetterdaten wurden freundlicherweise von Deutschen Wetterdienst zur Verfügung gestellt.

6.7.5 Speziesdifferenzierung/Subtypen

Borrelia garinii war mit 46,8% (133/284) die am häufigsten vertretene Spezies, besonders der Serotyp OspA Serotyp 6 mit 18,0% (51/284), gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto (70/284), *Borrelia afzelii* (42/284) und *Borrelia valaisiana* (28/284). Fünf Isolate konnten mittels RFLP und anschließender Sequenzierung nicht klassifiziert werden und wurden als *Borrelia burgdorferi* sensu lato eingeordnet. Mit Hilfe des Restriktionsenzym *Xba*I wurde in zwei Zecken der Subtyp *B. valaisiana* „subgroup II“ und die relativ neue Spezies *B. spielmanii* in drei Zecken gefunden. *Borrelia lusitaniae* konnte in nur einer einzelnen Zecke nachgewiesen werden. Dies war ein im Juni 2006 gesammeltes Weibchen. Die Prozentangaben können der Abbildung (Abb. 6.7.6) und die Anzahlen der Tabelle (Tab. 6.8) entnommen werden.

Ergebnisse

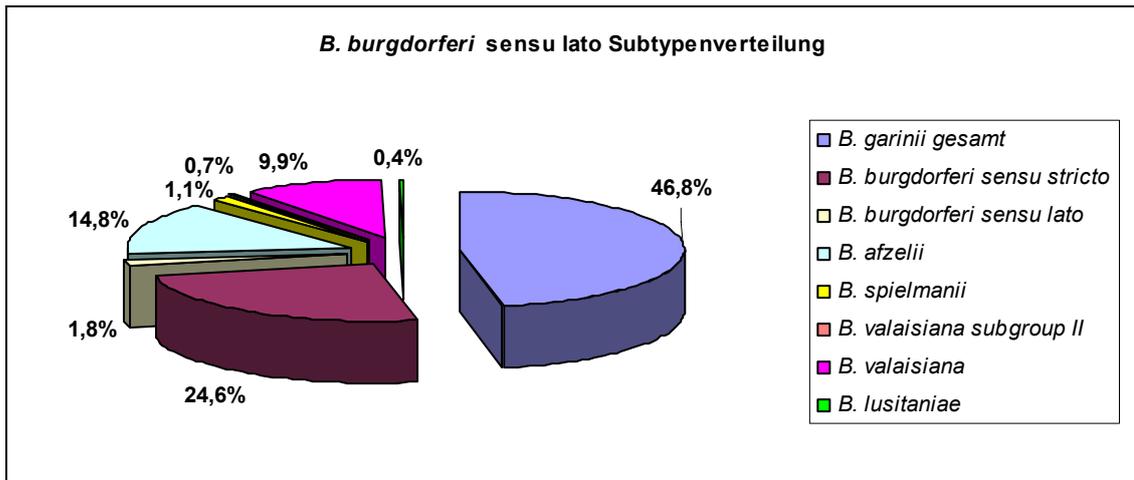


Abb. 6.7.6 Verteilung der Borrelien-Subtypen

In diesem Diagramm wurden die Häufigkeiten der verschiedenen Borrelien-Subtypen veranschaulicht. Doppelinfektionen wurden mit aufgelistet, d.h. eine Zecke kann zwei Subtypen beherbergen, so dass eine Gesamtzahl von 284 (100%) Subtypen vorliegt (270 Borrelien positive Zecken + 14 Subtypen aus einer Doppelinfektion siehe Kapitel 6.4).

Borrelien Subtypen	Vorkommen	Gesamtzahl mit Doppelinfektion
<i>B. burgdorferi sensu lato</i>	5	5
<i>B. lusitaniae</i>	1	1
<i>B. valaisiana</i>	25	28
<i>B. valaisiana subgroup II</i>	1	2
<i>B. spielmanii</i>	3	3
<i>B. afzelii</i>	38	42
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	64	70
<i>B. garinii</i> zusammengefasst	119	133
Summe	256	284

Aufschlüsselung von *B. garinii* nach OspA-Typen:

<i>B. garinii</i> nicht näher klassifizierbar	8	12
<i>B. garinii</i> Typ 3	2	3
<i>B. garinii</i> Typ 4	2	3
<i>B. garinii</i> Typ 5	34	37
<i>B. garinii</i> Typ 6	46	51
<i>B. garinii</i> Typ 7	12	12
<i>B. garinii</i> Typ 8	15	15

Tab. 6.8 Übersicht Subtypen *Borrelia burgdorferi* s.l.

Die Tabelle listet die Absolutzahlen der Borreliensubtypen auf. Es waren insgesamt 270 Zecken mit Borrelien infiziert, wovon 14 Zecken gleichzeitig mit 2 Borreliensubtypen doppelinfiziert waren. Subtrahiert man alle Zecken, die Doppelinfektionen beinhalteten, ergibt sich eine Gesamtzahl von 256 Subtypen. Rechnet man die doppelt infizierten Zecken dazu, erscheinen diese 14 Zecken zweimal und man erhält eine Summe von 284 Subtypen.

Ergebnisse

In den mit *B. garinii* infizierten nüchternen Zecken konnte der OspA Typ 6 mit 18,0% (51/284) am häufigsten ermittelt werden (Tab. 6.8) gefolgt von OspA Typ 5 mit 13,0% (37/284), OspA Typ 8 mit 5,3% (15/284), OspA Typ 7 (4,2%), OspA Typ 4 (1,1%) und Serotyp 3 (1,1%). Circa 4,4% der Isolate (12/284) konnten nicht näher bestimmt werden und wurden als *B. garinii* spp. eingeordnet (Abb. 6.7.7). Die Prozentangaben berücksichtigen die Doppelinfektionen, so dass man auf eine Gesamtzahl von 284 Subtypen kommt, obwohl nur 270 Zecken positiv waren. Vierzehn Zecken waren mit zwei Subtypen doppelt infiziert (siehe Kapitel 6.4).

B. garinii Serotyp 6 und Serotyp 8 weisen das selbe Restriktionsmuster beim RFLP-Verfahren nach Michel et al. (2004) auf, so dass ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xba*I nach Lencakowa et al. (2006) angeschlossen wurde. Dabei konnten 15 Proben als *B. garinii* Serotyp 8 von den vorher als *B. garinii* Typ 6 bezeichneten Proben (66/270), differenziert werden. Es ergibt sich somit eine neue Verteilung der OspA-Serotypen, die in der Abbildung (Abb. 6.7.7) veranschaulicht wird.

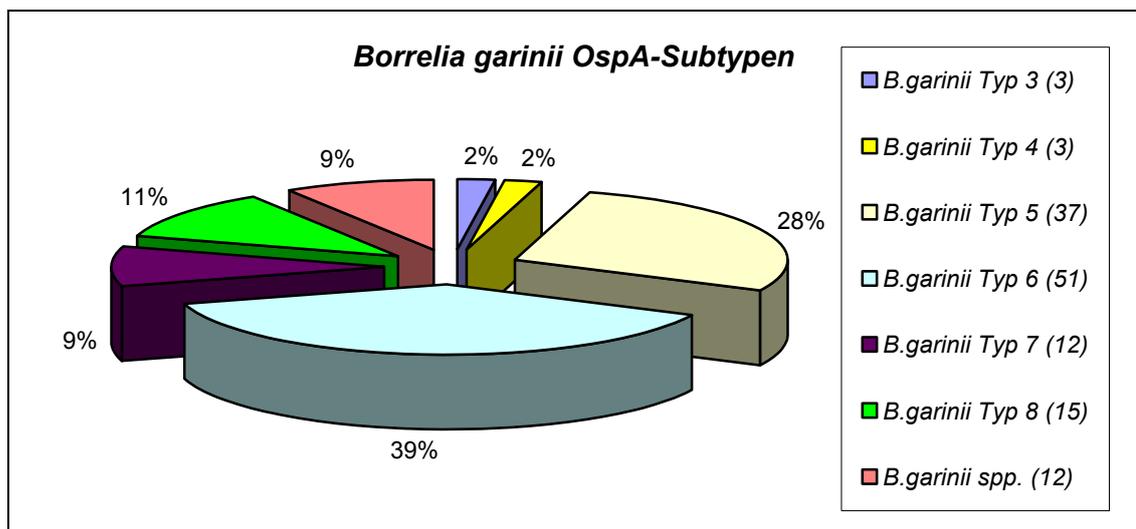


Abb. 6.7.7 Verteilung der *B. garinii* OspA-Serotypen

In dieser Abbildung wurden erneut die einzelnen *B. garinii* OspA-Serotypen dargestellt, da mit dem Restriktionsenzym *Xba*I auch zwischen *B. garinii* Typ 6 und Typ 8 unterschieden werden konnte.

Ergebnisse

Betrachtet man die Subtypenverteilung der *Borrelia burgdorferi* s.l.-Spezies in den einzelnen Zecken-Entwicklungsstadien, so konnte für die am häufigsten vertretene Spezies *B. garinii* eine hochsignifikant ($p < 0,0001$, $p < \alpha$) höhere Infektionsrate in adulten Zecken (92/1000) statt in Nymphen (27/1000) nachgewiesen werden. Besonders auffällig war, dass der Serotyp 8 fast ausschließlich in adulten Zecken nachgewiesen werden konnte. Für den Subtyp *B. burgdorferi* s.s. war die Prävalenz in Adulten (41/570) nicht signifikant ($p = 0,238$, $p > \alpha$) höher als in Nymphen (23/430). *B. afzelii*, die in dieser Studie am dritthäufigsten vorkommende Spezies, wurde ebenso nicht signifikant ($p = 0,264$, $p > \alpha$) häufiger in Adulten (25/570) als in Nymphen (13/430) nachgewiesen. *B. valaisiana* wurde gleichermaßen in Adulten wie in Nymphen nachgewiesen, *B. valaisiana* „subgroup II“ war in zwei adulten Stadien und *B. spielmanii* ausschließlich in Nymphen zugegen.

Die Infektionsrate mit *B. garinii* unterscheidet sich nicht signifikant ($p = 0,324$, $p > \alpha$) zwischen den beiden Untersuchungsjahren. Im Jahr 2006 betrug sie 12,3% (62/506) und steigt im darauf folgenden Jahr auf 14,4% (71/494) an. Für die anderen Spezies konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede belegt werden.

6.8 Babesien-Prävalenzen

6.8.1 Infektionsraten

In 5,0% der untersuchten Zecken konnte babesienspezifische DNA detektiert werden mit hochsignifikant unterschiedlichen Infektionsraten (Chi-Quadrat-Test $p < 0,0001$) von 1,9% (8/430) in Nymphen und 7,4% (42/570) in adulten Zecken (Tab. 6.9).

Ergebnisse

Babesien * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			Negativ	Positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	528	42	570
		% von Sex	92,6%	7,4%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-,6	2,5	
	Nymphen	Anzahl	422	8	430
		% von Sex	98,1%	1,9%	100,0%
		Standardisierte Residuen	,7	-2,9	
Gesamt		Anzahl	950	50	1000
		% von Sex	95,0%	5,0%	100,0%

Tab. 6.9 Babesien: Ergebnis Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

Eine Jahr zu Jahr Variation in der Prävalenz erscheint möglich, denn die Infektionsraten waren 2006 mit 7,9% (40/506) deutlich höher als im Jahr 2007 mit 2,0% (10/494) (Tab. 6.10, Tab. 6.12).

2006	Anzahl	Positiv	Quote	Männl	Quote	Nymphen	Quote	Weibl	Quote
				positive	positive	positive	positive	positive	positive
				2006	Männl	2006	Nymphen	2006	Weibl
Mai	86	9	10,47%	3	10,34%	2	7,14%	4	13,79%
Juni	87	3	3,45%	1	3,57%	1	3,33%	1	3,45%
Juli	87	11	12,64%	3	11,11%	0	0,00%	8	27,59%
August	94	13	13,83%	1	3,57%	4	10,53%	8	28,57%
Sept.	87	4	4,60%	0	0,00%	1	2,04%	3	11,54%
Oktober	65	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
Total	506	40	7,91%	8	5,67%	8	3,88%	24	15,09%

Tab. 6.10 Babesien Prävalenzen 2006

In der Tabelle sind die Durchseuchungsraten der 506 *I. ricinus* Zecken aus dem Jahr 2006 dargestellt.

Auch im Jahr 2006 waren nach dem Chi-Quadrat-Test ($p=0,005$, $p<\alpha$) signifikant mehr adulte *Ixodes ricinus* Zecken 10,7% (32/300) mit Babesien infiziert als Nymphen, die mit 3,9% (8/206) vertreten waren (Tab. 6.11).

Ergebnisse

Babesien 2006 * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			Negativ	Positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	268	32	300
		% von Sex	89,3%	10,7%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-,5	1,7	
	Nymphen	Anzahl	198	8	206
		% von Sex	96,1%	3,9%	100,0%
		Standardisierte Residuen	,6	-2,1	
Gesamt		Anzahl	466	40	506
		% von Sex	92,1%	7,9%	100,0%

Tab. 6.11 Babesien: Ergebnis 2006 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

Die Babesien-Prävalenzen waren in den 2007 gesammelten Zecken deutlich niedriger. Es konnte eine Gesamtinfektionsrate von 2,0% (10/494) ermittelt werden (Tab. 6.12).

2007	Anzahl	Positiv	Quote	Quote positive		Quote positive		Quote positive
				Männl.	Männl.	Nymphen	Weibl.	
April	80	1	1,25%	0	0,00%	0	1	4,17%
Mai	84	4	4,76%	4	14,29%	0	0	0,00%
Juni	84	1	1,19%	0	0,00%	0	1	3,57%
Juli	79	4	5,06%	1	4,35%	0	3	10,71%
August	105	0	0,00%	0	0,00%	0	0	0,00%
Septemb.	62	0	0,00%	0	0,00%	0	0	0,00%
Total	494	10	2,02%	5	3,68%	0	5	3,73%

Tab. 6.12 Babesien Prävalenzen 2007

Die Verteilung der Infektionsraten mit Babesien werden in dieser Tabelle für das Jahr 2007 ersichtlich. In diesem Jahr waren insgesamt nur 10 Zecken mit Babesien infiziert. Auffällig ist, dass keine Nymphe infiziert war.

Es war keine Nymphe aus dem Jahr 2007 mit Babesien infiziert. Adulte waren mit 3,7% (10/270) vertreten. Dieser Zusammenhang konnte mit Hilfe der Kreuztabelle (Tab. 6.13) als signifikant bestätigt werden (Chi-Quadrat-Test $p=0,004$, $p<\alpha$).

Ergebnisse

Babesien 2007 * Ergebnis Kreuztabelle

			Ergebnis		Gesamt
			Negativ	positiv	
Sex	Adulte	Anzahl	260	10	270
		% von Sex	96,3%	3,7%	100,0%
		Standardisierte Residuen	-,3	1,9	
	Nymphen	Anzahl	224	0	224
		% von Sex	100,0%	,0%	100,0%
		Standardisierte Residuen	,3	-2,1	
Gesamt	Anzahl	484	10	494	
	% von Sex	98,0%	2,0%	100,0%	

Tab. 6.13 Babesien: Ergebnis 2007 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test

6.8.2 Entwicklungsstadien

Die Befallsraten der Zecken mit Babesien variieren stark von Jahr zu Jahr und abhängig vom Zeckenentwicklungsstadium, was bei genauerer Betrachtung der Tabellen (Tab. 6.10 und Tab. 6.12) auffällt. Die Adulten sind sowohl im Jahr 2006 mit 10,7% (32/300) als auch im Jahr 2007 mit 3,7% (10/270) in den Infektionen häufiger vertreten als Nymphen, die 2006 eine Prävalenz von 3,9% (8/206) aufwiesen (Abb. 6.8.1, Abb. 6.8.2). Von den 2007 gesammelten Nymphen war keine mit *Babesia* spp. infiziert. In den Monaten mit den höchsten Infektionsraten dominieren meist die Weibchen. Nach dem Chi-Quadrat-Test ($p=0,005$, $p<\alpha$) sind also in der Gesamtheit beider Jahre betrachtet, signifikant mehr Adulte mit Babesien infiziert als Nymphen.

Ergebnisse

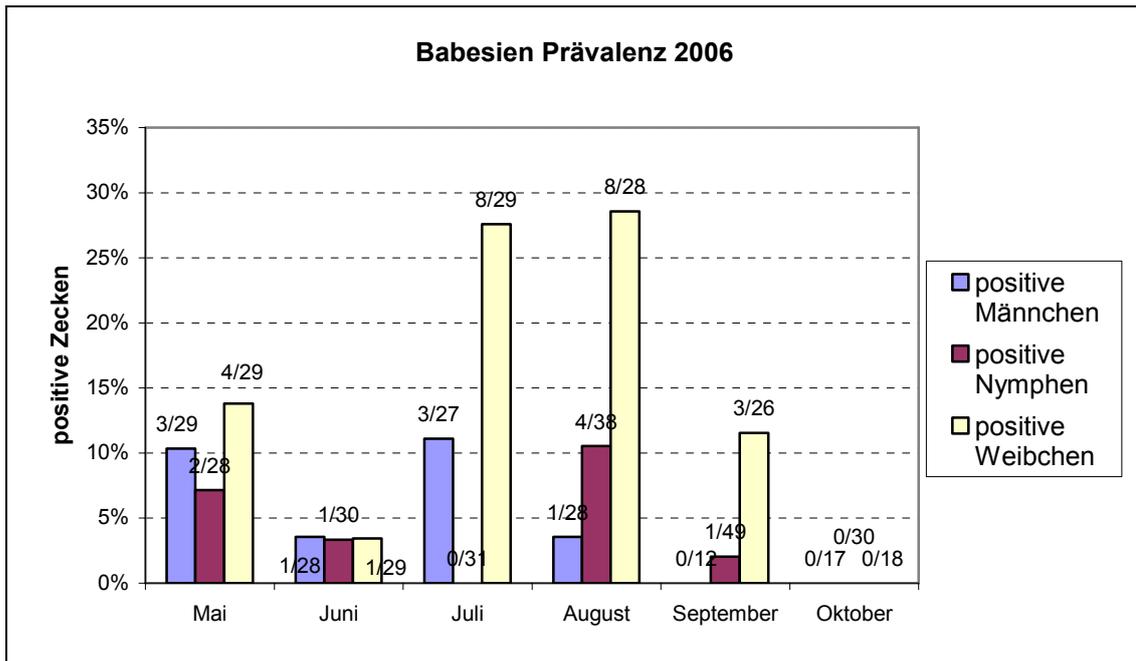


Abb. 6.8.1 Babesien: Prävalenz 2006 nach Entwicklungsstadien

Dargestellt sind die monatlichen Babesien-Infektionsraten der gesammelten Zecken für jedes einzelne Entwicklungsstadium. Die Weibchen dominieren in der Erregerprävalenz.

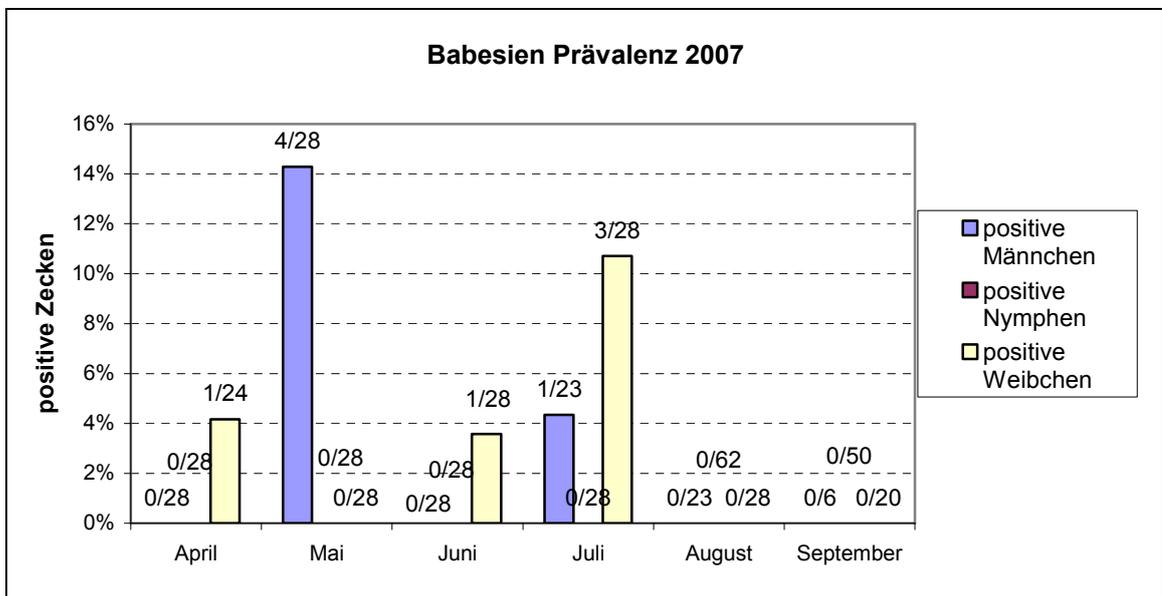


Abb. 6.8.2 Babesien: Prävalenz 2007 nach Entwicklungsstadien

Auch 2007 kann für jedes Entwicklungsstadium eine monatliche Babesien-Infektionsrate abgelesen werden, wobei nur in adulten Zecken Infektionen nachgewiesen werden konnten.

6.8.3 Saisonale Abhängigkeit

Bei Aufschlüsselung der saisonalen Prävalenzen entsprechend der Sammelmonate ist kein homogener Kurvenverlauf ersichtlich. Man erkennt ein Maximum an babesieninfizierten Zecken im Hochsommer 2006 (Juli/August). In diesen Monaten war auch die Borrelien-Infektionsrate am höchsten. Ab Oktober konnten keine mit *Babesia* spp. infizierten Zecken gefunden werden und auch die Borrelien-Infektionsrate brach deutlich ein. Auffällig war auch, dass es zu diesem Zeitpunkt sehr schwierig war, Zecken zu fangen, da sie deutlich inaktiver waren.

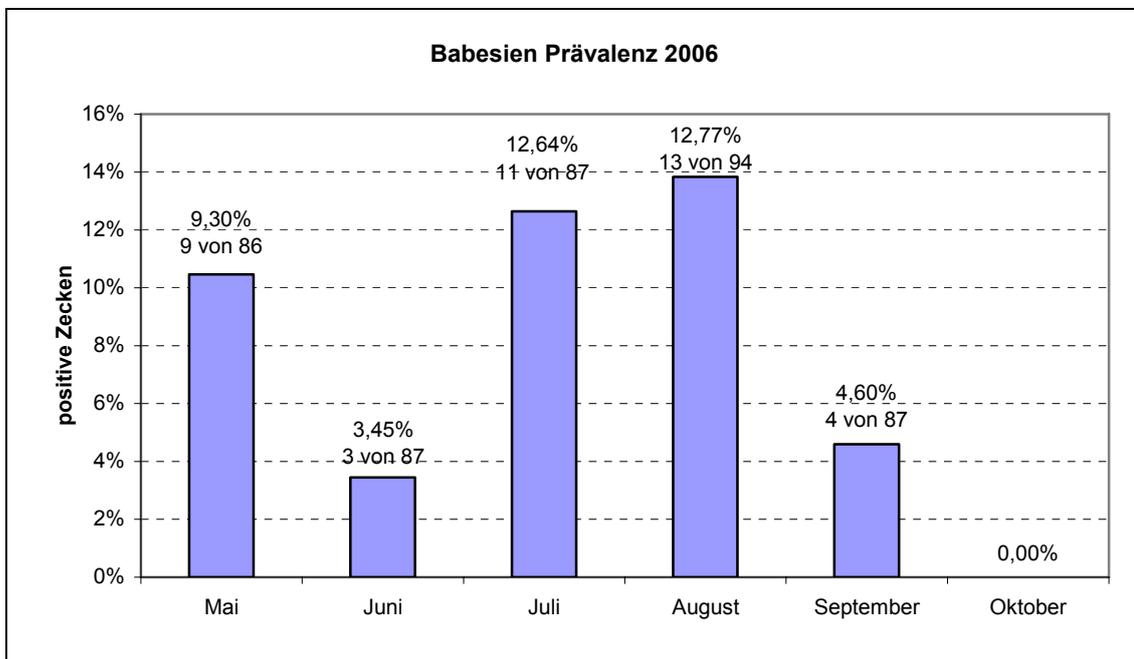


Abb. 6.8.3 Babesien: Saisonale Prävalenz 2006

In der Abbildung 6.8.3 ist die für das Jahr 2006 monatliche Babesien-Prävalenz abgebildet. Deutlich erkennbar ist der Peak im Juli/August.

Für das Jahr 2007 lassen sich deutlich schwieriger Aussagen über den jahreszeitlichen Prävalenzverlauf machen, da nur in 10 *Ixodes ricinus* Zecken eine Babesieninfektion nachgewiesen werden konnte (Abb. 6.8.4). Im Juli 2007 wurden durch das Thüringer Forstamt Waldaufräumungs- und Forstarbeiten im Sammelgebiet durchgeführt. Die niedrigen Infektionszahlen lassen sich damit durch das erheblich reduzierte Zeckenvorkommen und den deutlichen Rückgang ihre Wirtspopulation (besonders Mäuse) erklären.

Ergebnisse

Beim Zeckenfang ist aufgefallen, dass gegen Ende der Fangsaison kaum noch Adulte zu finden waren, so dass in den letzten Monaten vermehrt Nymphen untersucht wurden (Tab. 4.2), die geringere Infektionszahlen erwarten lassen (siehe Kapitel 6.8.2).

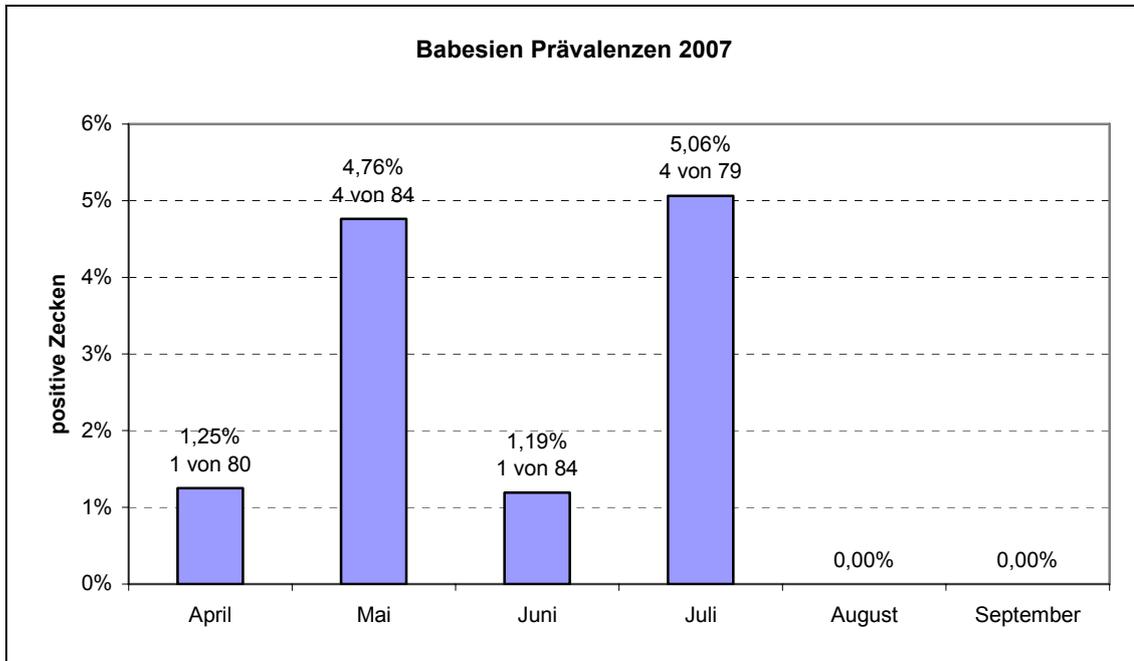


Abb. 6.8.4 Babesien: Saisonale Prävalenz 2007

Wie aus der Abbildung hervorgeht, waren nur 10 Zecken in diesem Jahr mit Babesien infiziert. Eine rein zufällige Verteilung der monatlichen Prävalenz kann damit nicht ausgeschlossen werden.

6.8.4 Abhängigkeit vom Wetter

Auf Grund zu geringer Prävalenzen mit Babesien in den untersuchten Jahren lässt sich kein Zusammenhang zum Wetter ermitteln. Die Temperatur- und Luftfeuchtigkeitskurve spiegelt lediglich zufällig die Aktivität der *Ixodes ricinus* Zecken wieder.

6.8.5 Speziesdifferenzierung/Subtypen

Für *Babesia microti* konnte eine geringfügig höhere Prävalenz (28/50) als für *Babesia divergens* (20/50) nachgewiesen werden. Zwei Isolate konnten nur als *Babesia* spp. charakterisiert werden (Tab. 6.14).

Ergebnisse

	<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>		<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>	<i>Babesia</i>
2006	<i>microti</i>	<i>divergens</i>	spp.	total	2007	<i>microti</i>	<i>divergens</i>	total
Mai	5	4	0	9	April	0	1	1
Juni	1	2	0	3	Mai	3	1	4
Juli	7	4	0	11	Juni	0	1	1
Aug.	9	2	2	13	Juli	0	4	4
Sept.	3	1	0	4	Aug.	0	0	0
Okt.	0	0	0	0	Sept.	0	0	0
Total	25	13	2	40	Total	3	7	10

Tab. 6.14 Subtypen Babesien

In dieser Tabelle ist das Vorkommen der *Babesia* spp. Subtypen in den 2006 und 2007 gesammelten *Ixodes ricinus* Zecken aufgelistet.

6.9 Prävalenzen Koinfektionen

6.9.1 Koinfektionen Babesien/Borrelien

5,9% (16 von 270) der Borrelien infizierten Zecken waren mit Babesien koinfiziert, (siehe dazu Abb. 6.6.2 Seite 60 im Kapitel 6.6.) Somit stellen insgesamt 1,6% der 1000 untersuchten Zecken Koinfektionen dar. Es waren 9 Männchen, 7 Weibchen und keine Nymphe mit beiden Erregern koinfiziert. Bei den Babesien wurden zehn *B. microti* und sechs *B. divergens* Isolate in einer Koinfektion detektiert.

Der Borreliensubtypenanteil gestaltete sich wesentlich heterogener: 6 Zecken mit *B. garinii*, 4 mit *B. burgdorferi* sensu stricto, 3 mit *B. afzelii*, eine mit *B. valaisiana*, eine mit *B. burgdorferi* sensu lato und eine koinfizierte Zecke wies sogar eine Doppelinfektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto als auch *B. garinii* auf. Das Vorkommen von diesen Koinfektionen in den einzelnen Untersuchungsmonaten kann der Tabelle (Tab. 6.15) entnommen werden.

Ergebnisse

Mai 2006	2	April 2007	1
Juni 2006	1	Mai 2007	4
Juli 2006	4	Juni 2007	0
August 2006	1	Juli 2007	2
September 2006	1	August 2007	0
Oktober 2006	0	September 2007	0

Tab. 6.15 Koinfektionen Borrelien/Babesien in den einzelnen Monaten

Im Juli 2006 und Mai 2007 konnten die meisten Koinfektionen mit *Borrelia burgdorferi* s.l. und *Babesia* spp. in Zecken gefunden werden (Tab. 6.15), das waren auch die Monate mit den annähernd höchsten Prävalenzen beider Erreger (Abb. 6.7.3, Abb. 6.7.4, Abb. 6.8.3, Abb. 6.8.4). Eine weibliche Zecke beinhaltete sogar eine Dreifachinfektion mit *Babesia microti*, *Borrelia garinii* Typ 5 und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

6.9.2 Mehrfachinfektionen mit Borrelien, Babesien, Anaplasmen und Rickettsien

Die 1000 gesammelten *Ixodes ricinus* Zecken wurden im Rahmen einer zweiten Dissertation (Krämer 2009) auch auf Infektionen mit Anaplasmen, Rickettsien und auftretenden Koinfektionen untersucht. Am häufigsten in einer Mehrfachinfektion vertreten, waren Borrelien/Rickettsien (40/1000), gefolgt von Rickettsien/Babesien (19/1000), Borrelien/Anaplasmen (16/1000) und Borrelien/Babesien (16/1000). Zehn Zecken beinhalteten Koinfektionen mit Rickettsien/Anaplasmen, zwei Zecken Babesien/Anaplasmen (Abb. 6.9.1).

Es konnten auch Infektionen mit 3 Erregern in einigen Zecken nachgewiesen werden. Das waren im Einzelnen: 6 Zecken mit Borrelien/ Rickettsien/Babesien, 4 Zecken mit Borrelien/Rickettsien/Anaplasmen sowie 1 Zecke mit Rickettsien/ Babesien/Anaplasmen (Abb. 6.9.2). Keine der untersuchten Zecken war mit allen 4 Erregern infiziert.

Ergebnisse

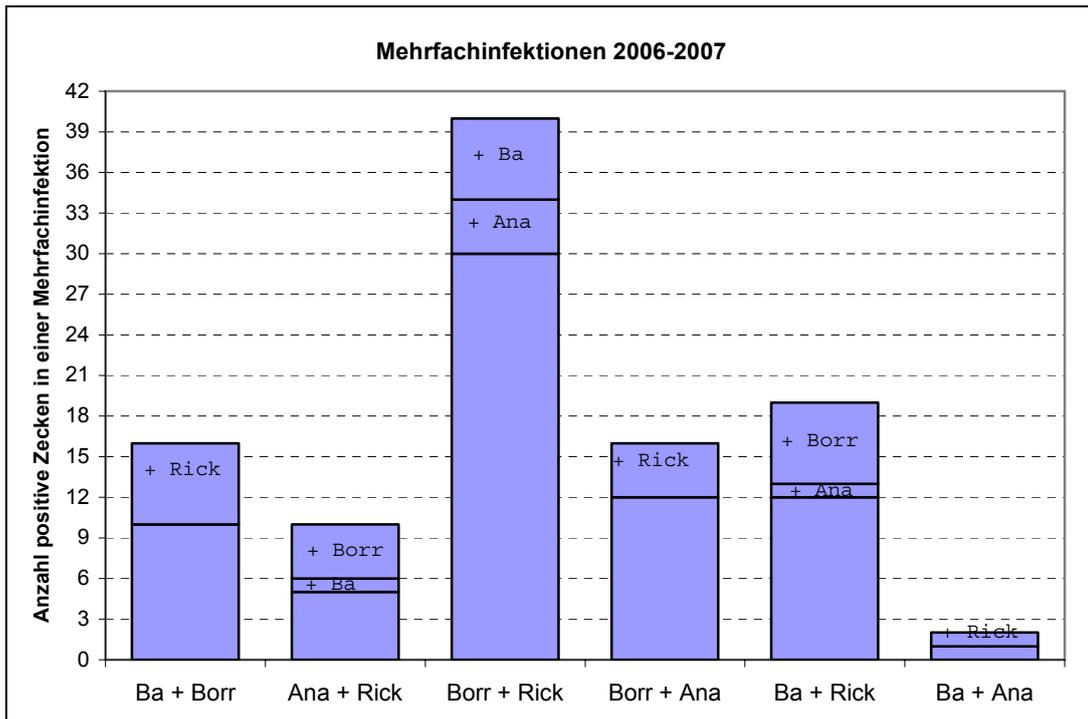


Abb. 6.9.1 Mehrfachinfektionen

In diesem Diagramm sind die Doppelinfektionen abgebildet. Diese setzen sich, wie aus dem Diagramm ersichtlich, auch aus Dreifachinfektionen zusammen. Borrelien und Rickettsien (40/1000) treten in Kombination deutlich häufiger auf als andere Mehrfachinfektionen. (Ba-Babesien, Borr-Borrelien, Rick-Rickettsien, Ana-Anaplasmen)

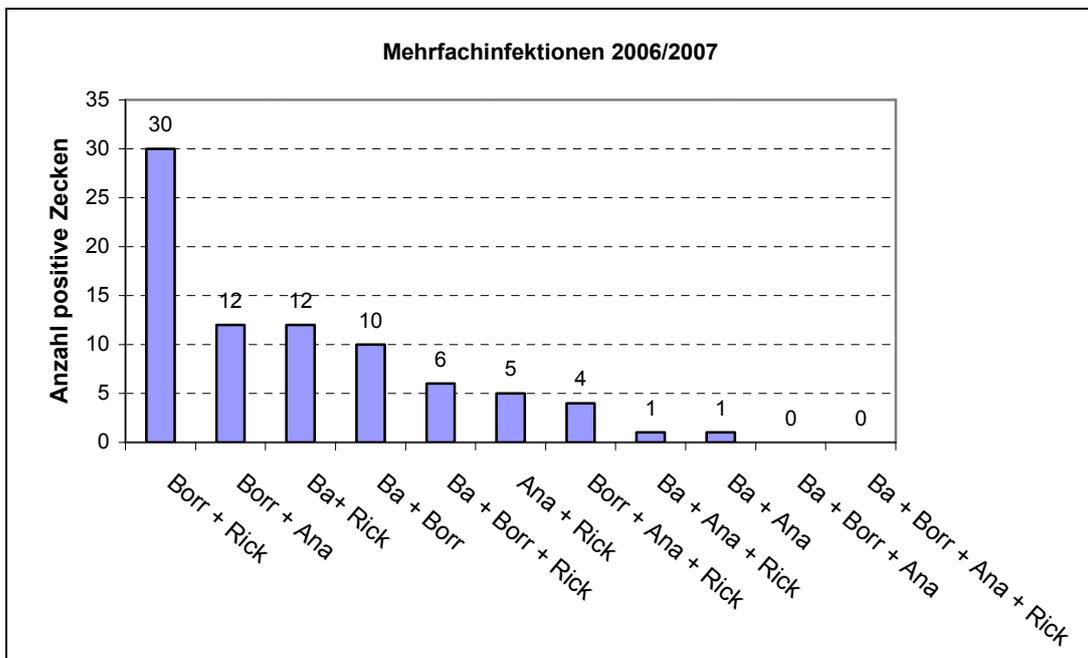


Abb. 6.9.2 Doppel- und Dreifachinfektionen der Zecken

Keine Zecke weist eine Infektion mit allen 4 Erregern auf. Dreifachinfektionen sind in 11 Zecken vertreten. Eine Zecke erscheint in diesem Diagramm nur einmal, entweder als Doppel- oder als Dreifachinfektion. (Ba-Babesien, Borr-Borrelien, Rick-Rickettsien, Ana-Anaplasmen)

Ergebnisse

Betrachtet man die Infektionen nach den einzelnen Entwicklungsstadien, fällt auf, dass auch hier vorwiegend adulte Zecken statt Nymphen infiziert sind. Besonders das Auftreten von Infektionen mit Borrelien und Babesien scheint an das adulte Entwicklungsstadium gebunden zu sein, denn auch in den Dreifachinfektionen Borrelien/Babesien/Rickettsien ist keine Nymphe vertreten (Tab. 6.16).

Entwicklungsstadium	BorrRick	BorrAna	BaRick	BaBorr	BaBorr+	
					Rick	AnaRick
Männchen	11	4	2	5	4	3
Weibchen	15	4	7	5	2	1
Nymphe	4	4	3	0	0	1
Total	30	12	12	10	6	5

Entwicklungsstadium	BorrAna+	BaAna+	BaAna	BaBorrAna	BaBorr+
	Rick	Rick		AnaRick	
Männchen	2	0	0	0	0
Weibchen	1	1	1	0	0
Nymphe	1	0	0	0	0
Total	4	1	1	0	0

Tab. 6.16 Mehrfachinfektionen nach Entwicklungsstadium

6.10 Statistische Ergebnisbetrachtung

Beim Chi-Quadrat-Test wurde ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,001$ als hochsignifikant betrachtet. Bezüglich der Infektion der Zecken mit Borrelien zeigte sich eine hochsignifikant höhere Prävalenz des Erregers in Adulten als in Nymphen ($p < 0,001$). Diese Signifikanz war auch für die mit Babesien infizierten Zecken zu finden ($p < 0,0001$). Dabei wurden die Kreuztabellen (Tab. 6.3 und Tab. 6.9) verwendet. In der Tabelle (Tab. 8.1) im Anhang auf den Seiten 112-113 sind die jeweiligen 95%-Konfidenzintervalle der Hauptaussagen mit ihren entsprechenden oberen und unteren Grenzen angegeben. Die Konfidenzintervalle wurden mit Hilfe der Website: <http://faculty.vassar.edu/lowry/prop1.html> berechnet und mit Kontinuitätskorrektur angegeben.

7 Diskussion

7.1 Borrelien

7.1.1 Prävalenz

Es gibt deutliche Unterschiede in der Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* Zecken in den unterschiedlichen Regionen der Welt und innerhalb Europas. Während in Europa vom Vorkommen mindestens 5 verschiedener Spezies berichtet wird, scheint in Amerika nur eine einzige als humanpathogen geltende Spezies, *B burgdorferi* sensu stricto, vertreten zu sein (Fingerle et al. 2008).

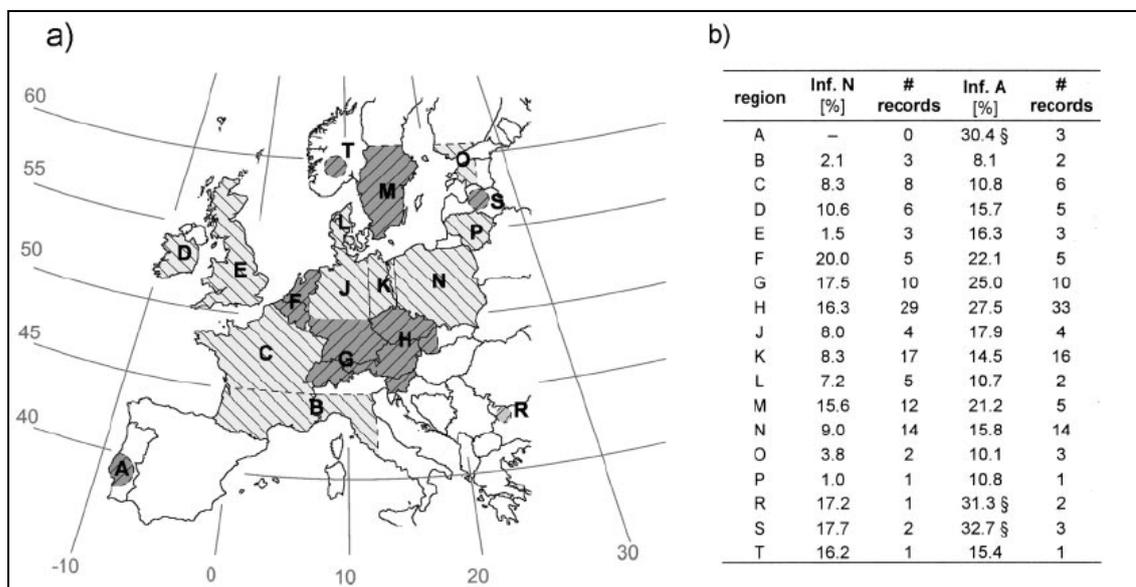


Abb. 7.1.1 Karte: Definierte Regionen zur Borrelienprävalenz

(a) Regionen mit kleinen Infektionsraten sind hellgrau (Nymphen<11,0%, Adulte<20,0%), Regionen mit höheren Infektionsraten wurden dunkelgrau dargestellt. (b) Regionen und Infektionsraten der Nymphen (Inf.N) und der Adulten (Inf.A) sind aufgelistet. Die Anzahl der Untersuchungen wird in der Spalte (records) angezeigt. Das Paragraphenzeichen kennzeichnet besonders hohe Prävalenzen. Die Abbildung stammt aus der Metaanalyse von Rauter und Hartung (Rauter und Hartung 2005) und verdeutlicht die unterschiedlichen Prävalenzen innerhalb Europas.

Diskussion

In der von Rauter und Hartung erhobenen Metaanalyse konnte für Europa eine durchschnittliche Gesamteinfektionsrate mit Borrelien von 13,7% (15.423/112.579) festgestellt werden (Rauter und Hartung 2005). Aus Polen und der Slowakei wird von regional schwankenden Gesamtprävalenzen im Bereich von 8,0%-22,5% berichtet (Lencakova et al. 2006). In Kroatien und Norditalien wurden Durchseuchungsraten von 45% bzw. 50% dokumentiert (Rijpkema et al. 1996) und aus Dänemark ist eine Prävalenz von 11% bekannt (Skarphedinsson et al. 2007). Die in der vorliegenden Studie erhobene Infektionsrate von 27,0% für das Habitat Zeitgrund in Mittelthüringen liegt sehr nahe an den Ergebnissen anderer Studien deutscher Regionen. So beschreiben z.B. Fingerle et al. in ihrer süddeutschen Untersuchung von 2155 *I. ricinus* Zecken eine Infektionsrate von 22% mit Borrelien des Bbsl-Komplexes (Fingerle et al. 2008) und aus Thüringen sind Prävalenzen von 10%-36% bekannt (Hildebrandt et al. 2003, Kipp et al. 2006).

In nahezu allen Studien wird eine signifikant höhere Infektionsrate der adulten Zecken verglichen mit den Nymphen beschrieben (Rauter und Hartung 2005, Kipp et al. 2006, Lencakova et al. 2006, Fingerle et al. 2008). So sind im Durchschnitt 1% der Larven, 10% der Nymphen und 20% der adulten Zecken infiziert (Fingerle et al. 1995, Rijpkema et al. 1996, Kirstein et al. 1997, Hubalek und Halouzka 1998, Kampen et al. 2004). Auch für den Zeitgrund/Stadtroda konnten mit dieser Arbeit hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen Adulten und Nymphen belegt werden. Adulte waren mit 32,3% (184/570), Nymphen mit 20,0% (86/430) vertreten. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Übertragung von Borrelien innerhalb der Zeckengeneration vor allem transstadial erfolgt, die transovarische Übertragung scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Ein in der Literatur (Gray 1991, Kahl et al. 1992, Sonenshine 1993, Gray et al. 1999, Jensen 2000, Eckert et al. 2005) beschriebener bimodaler Verlauf der saisonalen Zeckenaktivität mit zwei Häufigkeitsgipfeln, konnte mit dieser Studie nicht bestätigt werden. Weder in den Prävalenzen der Erreger, noch in der Fangausbeute der *Ixodes ricinus* Zecken spiegelte sich dieser saisonale Verlauf wieder.

Für adulte Zecken wird meist ein Häufigkeitsgipfel im September/Oktober beschrieben (Kubiak und Dziekonska-Rynko 2006). Im Thüringer Zeitgrund war es in diesen Monaten in beiden Jahren besonders schwierig, adulte Entwicklungsstadien zu finden. Auch die 2006/2007 im Zeitgrund beobachtete Abhängigkeit der Infektionsrate von Wetterbedingungen, wie z.B. der mittleren Temperatur und Luftfeuchtigkeit, konnte nicht ausreichend bestätigt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen über eine längere Zeitperiode nötig.

Die Infektionsrate für Borrelien (27,0%) lag insgesamt wesentlich höher als die für Babesien (5,0%), was den Beobachtungen anderer Untersuchungsgebiete entspricht (Skotarczak et al. 2002, Hunfeld et al. 2002, Hartelt et al. 2004).

7.1.2 Spezies- und SpA-Typenverteilung

Die in Europa in Zecken durchschnittlich am meisten detektierte BbSl-Spezies ist *B. garinii* (38,0%), gefolgt von *B. afzelii* (33,0%) und *B. burgdorferi* sensu stricto (18,0%) (Rauter und Hartung 2005). *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und *B. spielmanii* scheinen deutlich weniger frequentiert vorzukommen (Rauter et al. 2002, Michel et al. 2004). *B. garinii* (49,3%) besonders Serotyp SpA Typ 6 (mit 49,6% aller als *B. garinii* identifizierter Subtypen) konnte auch in dieser Studie als am häufigsten vertretene Spezies nachgewiesen werden. Die Verteilung der Subtypen scheint regionalen Schwankungen zu unterliegen, so wurde überraschenderweise *B. burgdorferi* s.s. (26,0%) in dieser Arbeit als zweithäufigster Borrelien-Vertreter, noch vor *B. afzelii* (15,6%) identifiziert. Andere Studien beschreiben die selben Beobachtungen sowohl für Polen (Encakova et al. 2006) als auch für Thüringen (Dorn et al. 1999, Steil 2002, Hildebrandt et al. 2003). In sehr vielen Studien wird von einer Zunahme der Prävalenz der Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto von Ost nach West berichtet (Rijpkema et al. 1996, Tresova et al. 1998, Gern und Humair 1998, Stanczak et al. 2000, Hildebrandt et al. 2003, Jouda et al. 2003, Stanczak et al. 2004, Michel et al. 2004). Im Zeitgrund war *B. valaisiana* in 12,2% der Fälle an den Zecken-Infektionen beteiligt. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, war *B. valaisiana* die häufigste nachgewiesene Spezies in einer Studie des Thüringer Eichsfeldes mit 45,0% der 15,2% (39/256) infizierten Zecken (Köp et

al. 2006). In drei Zecken konnte der relativ neu entdeckte Stamm A14S/*B. spielmanii* identifiziert werden. Die Spezies *B. lusitaniae* konnte ähnlich einer Studie von Fingerle et al. in nur einer Zecke nachgewiesen werden (Fingerle et al. 2008). Aus Serbien hingegen wird von führender Dominanz dieser Spezies berichtet (Milutinovic et al. 2008) und auch in Dänemark ist die Spezies wahrscheinlich deutlich stärker vertreten als in Deutschland (Vennestrom et al. 2008), wobei zu beachten ist, dass frühere Untersuchungen nur die drei Spezies *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto eingeschlossen haben.

Als eine mögliche Erklärung für diese lokal unterschiedlichen Ergebnisse kann eine gewisse Wirtspräferenz der einzelnen *Borrelia*-Genospezies, sowie das Vorhandensein unterschiedlicher Populationen von Wirtstieren angesehen werden. Für *B. valaisiana* und *B. garinii* stellen Vögel wahrscheinlich das Hauptreservoir dar. *B. afzelii* und einige *B. garinii* Stämme bevorzugen hingegen Nagetiere als Wirte in ihrem Lebenszyklus (Olsen et al. 1995, Kurtenbach et al. 1995, Kipp et al. 2006, Taragel'ova et al. 2008).

Die Subtypenverteilung scheint unabhängig vom Zecken-Entwicklungsstadium zu erfolgen, denn weder in der Metaanalyse von Rauter und Hartung (Rauter und Hartung 2005), noch in der eigenen Arbeit konnte ein signifikanter Unterschied diesbezüglich festgestellt werden. Folgende Spezies gelten als sicher humanpathogen: *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto, wobei ein gewisser Organotropismus zu bestehen scheint. So konnten Wilske und Mitarbeiter aus Liquor von Patienten mit Neuroborreliose besonders *B. garinii* OspA Typ 6 isolieren (Wilske et al. 1996). Das Erythema migrans soll von allen Spezies gleichermaßen hervorgerufen werden, während *B. afzelii* vorwiegend für die Akrodermatitis chronica atrophicans und *B. burgdorferi* sensu stricto für die Lyme-Arthritis verantwortlich zu sein scheint. In neusten Studien wird dieser Organotropismus allerdings kontrovers diskutiert (Fingerle et al. 2008), denn man geht davon aus, dass in den älteren Studien nur die bis dato bekannten Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* berücksichtigt wurden. Verwirft man die Organotropismus-Theorie und vertritt die Annahme, dass alle *B. burgdorferi* s.l.-Spezies gleichermaßen von Zecken

auf den Menschen übertragen werden, so müsste in den verschiedenen organspezifischen Patientenproben das Speziesmuster dem gefundenen Speziesmuster der Zecken entsprechen. Für *B. afzelii* kann laut der Untersuchung von Fingerle et al. diese Annahme verneint werden. *B. afzelii* scheint für Hautmanifestationen besonders das ACA verantwortlich zu sein, der Zusammenhang zwischen Neuroborreliose und *B. garinii* konnte hier allerdings nicht bestätigt werden (Fingerle et al. 2008). Zur Klärung dieses Sachverhalts müssen aber noch weitere epidemiologische Untersuchungen sowohl von Zecken als auch von Patientenmaterialien folgen.

Doppelinfektionen der Zecken mit mehr als einem Vertreter des Bbsl-Komplexes wird eine herausragende Bedeutung zugesprochen. Differierende Prävalenzen werden berichtet. Das kombinierte Auftreten von *B. garinii* mit *B. afzelii* und von *B. garinii* mit *B. b.s.s.* dominiert meist in diesen Doppelinfektionen (Rauter und Hartung 2005). In einer Thüringer Studie des Instituts für Ernährungswissenschaften (Steil 2002) traten in 9,1% der Fälle Koinfektionen mit *B. garinii* und *B. burgdorferi* s.s. auf. Zusätzlich wurden Doppelinfektionen der Zecken mit *B. garinii* in Kombination mit *B. afzelii* (0,8%) bzw. *B. afzelii* mit *B. burgdorferi* s.s. (1,6%) beobachtet. Auch in der vorliegenden Studie Thüringens waren 5,2% (14/270) der borrelieninfizierten Zecken mit mehreren Bbsl-Subtypen doppelinfiziert. *B. garinii* dominierte dabei in Kombination mit *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* und *B. afzelii*. Nur eine Zecke wies eine Doppelinfektion mit *B. afzelii* und *B. valaisiana* auf.

7.1.3 Ausblick

Zum Nachweis von Borrelien sowohl aus Zecken als auch aus Patientenmaterialien eignen sich verschiedenste Nachweisverfahren, die zum Teil allerdings noch deutliche Defizite aufweisen und aktuell kontrovers diskutiert werden. Besonders im Frühstadium der Erkrankung, der Therapiekontrolle und der Erfassung neuer Spezies kommen diese Defizite zum Tragen. Im Rahmen einer Befragung beim Lyme-Borreliose-Workshop des Robert-Koch-Instituts (RKI) am 8. und 9. Oktober 2008 kristallisierte sich deutlicher Handlungsbedarf heraus der bezüglich Etablierung standardisierter Routinediagnostikverfahren, epidemiologischer Datenerhebungen und immunologischer Forschungsarbeiten

Diskussion

(Poggensee et al. 2008). Der Polymerasekettenreaktion (PCR) kommt dabei eine immer größer werdende Bedeutung zu. Dazu sind unterschiedliche DNA-Bereiche geeignet wie z.B. die Oberflächenantigene *OspA*, *OspB* und *OspC* und ribosomale RNA-Gene. Auch in den vorliegenden Untersuchungen wurde in Anlehnung an Michel et al. (Michel et al. 2004) über Amplifizierung des *ospA*-Gens gearbeitet. Andere Genbereiche sind das *flagellin*-Gen, das *p66*-Gen, die intergenische "spacer" Region zwischen 5S-rDNA und 23S-rDNA (Kirstein et al. 1997, Alekseev et al. 2001) oder zwischen 16S-rDNA und 23S-rDNA (Liveris et al. 1995), die 23S-rDNA (Maiwald et al. 1998), sowie die 16S-rDNA (Wilske et al. 1992, Wilske et al. 1993). Die PCR stellt eine zeit- und kostengünstige Alternative zu bisherigen Nachweisverfahren dar, allerdings ist die Sensitivität begrenzt und deutlich abhängig vom Untersuchungsmaterial: so beträgt sie in Gelenkpunktaten: 50-70%, in Hautbiopsaten: 50-70% und im Liquor 10-30% (Wilske et al. 2000, Nau et al. 2009). Die Sekundäramplifikation ('semi-nested' PCR) hat in der vorliegenden Studie die Sensitivität der PCR wesentlich erhöht: In der ersten PCR waren nur 57 Proben positiv, nach 2. PCR waren zusätzlich noch 229 Proben positiv. Auch ein kultureller Erregernachweis ist zur Borreliendiagnostik möglich, gelingt allerdings nicht aus allen Patientenmaterialien und ist sehr zeit- und kostenaufwendig. Aufgrund fehlender Standardisierungen und mangelhafter Verfügbarkeit in Routinelaboratorien sollte die Anwendung von direktem Erregernachweis und PCR jedoch auf spezielle Indikationen beschränkt bleiben z.B. bei zweifelhaften klinischen und serologischen Befunden (Nau et al. 2009). Im mikrobiologischen Routinelabor kommen oft folgende diagnostische Tests zum Einsatz: IFAT (Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test), Dunkelfeldmikroskopie, PFGE, oder nach Kultivierung die SDS-Pagegelelektrophorese und serologische Verfahren wie z.B. ELISA, EIA und der Immunoblot. Empfohlen wird von der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie im MIQ 12/2000 (Wilske et al. 2000) eine sogenannte Stufendiagnostik. Als Suchtest sollte ein sensitiver ELISA, der IgG- und IgM-Antikörper differenziert, zur Anwendung kommen. Dabei ist zu beachten, dass Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten wie z.B. *Treponema pallidum* auftreten können. Bei positivem oder grenzwertigem Ergebnis soll als Bestätigungstest ein Immunoblot durchgeführt werden (Wilske et al. 2000).

Diskussion

In der Praxis ist die Serologie allerdings mit einigen Problemen behaftet, da bei diesen Tests über den Nachweis Borrelien-spezifischer Antikörper gearbeitet wird. Diese Antikörper bilden sich jedoch erst nach Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger- *Borrelia burgdorferi* s.l. und können jahrelang im Körper persistieren. Eine Feststellung der Erregeraktivität ist demnach nicht möglich und die Serologie eignet sich nicht zur Therapiekontrolle. Da die Bildung der Antikörper einige Zeit beansprucht, kann es besonders in der Frühphase der Erkrankung zu falsch-negativen Befunden kommen. Allerdings ist die Serologie jedoch oft falsch-positiv durch hohe Durchseuchungsraten in der Bevölkerung, was Ärzte zur unnötigen Antibiotikatherapie veranlasst, obwohl die Patienten keine typische Klinik aufzeigen. Die Borreliose ist in den letzten Jahren regelrecht zu einer „Modediagnose“ verkommen und bei allen unklaren und untypischen Patientenbeschwerden wird eine Borreliose vermutet (Nau et al. 2009). Es sollte bedacht werden, dass die Lyme-Borreliose eine klinische Diagnose ist, wobei klinische Kriterien für die Interpretation serologischer Befunde maßgeblich sind. Beim Auftreten des typischen Hautausschlags, dem Erythema migrans kann auf die serologische Bestätigung verzichtet werden, da in diesem Fall eine Antibiotkatherapie unabdingbar ist (Wilske et al. 2000).

Ein weiteres diagnostisches Problem stellen Doppelinfektionen dar, die mittels der in Routinelaboratorien eingesetzten Serologie nicht erkannt werden und auch bei der Subtypenermittlung stößt die Serologie an ihre Grenzen. Es kann ebenfalls zu falsch-negativen Ergebnissen kommen, wenn Antigenstrukturen neu entdeckter *Borrelia*-Spezies nicht bei den herkömmlichen serologischen Testverfahren berücksichtigt werden. Die Spezies *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* und die relativ neue Spezies *B. spielmanii* können durch bisher kommerziell erhältliche serologische Tests nicht erfasst werden (Zacharias 2008). Im Sommer 2009 soll allerdings ein Test der Firma Mikrogen eingeführt werden bei dem zumindest noch zusätzlich die Spezies *B. spielmanii* berücksichtigt werden soll. Denn für diese Spezies wird von einigen Autoren Humanpathogenität vermutet, so konnten Fingerle und Mitarbeiter die Spezies A14S (*B. spielmanii*) in 4 Fällen beim Erythema migrans detektieren (Fingerle et al. 2008). Ob dies neue Probleme in der diagnostischen Serologie mit sich bringt, bleibt allerdings offen (Fingerle et al. 2008). Es stellt sich außerdem die Frage, ob der großen

Diskussion

Heterogenität des *ospA*-Gens mit diesen Verfahren ausreichend Rechnung getragen werden kann. Zur Speziesdifferenzierung ist die PCR des *ospA*-Gens mit anschließender RFLP-Methode nach Michel und Mitarbeiter (Michel et al. 2004), wie sie auch in dieser Studie zur Anwendung kam, geeignet. Besonders zur Detektion aller bisher bekannten *B. garinii* Serotypen, zur Ermittlung der Spezies *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* und zur Ermittlung von Doppelinfektionen eignet sich dieses Verfahren. Zur Differenzierung zwischen *B. valaisiana* „subgroup II“ und *B. spielmanii* sowie zwischen *B. garinii* Serotyp 6 und Serotyp 8 eignet sich besonders der an die RFLP-Methode angeschlossene Verdau mit dem Enzym *XbaI* (Lencakova et al. 2006). Auch in unserer Studie konnte damit zwischen *B. garinii* Typ 6 (51/1000) und *B. garinii* Typ 8 (15/1000), sowie zwischen *B. valaisiana* „subgroup II“ (2/1000) und *B. spielmanii* (3/1000) unterschieden werden. Aber auch die DNA-DNA-Hybridisierung (Wilske et al. 1993, Damaerschallck et al. 1995) oder Klonierung mit nachfolgender Sequenzierung (Wilske et al. 1988, Wilske et al. 1993) stellen zweckmäßige Verfahren dar, besonders in der Erfassung von Doppel- und Mehrfachinfektionen. Diese Verfahren sind allerdings sehr zeitaufwendig und nicht für die Routinediagnostik geeignet. Zur Detektion von Doppelinfektion kann als ein zuverlässiges Verfahren der Restriktionsverdau herangezogen werden, wie er auch in dieser Studie verwendet wurde. Die PCR eignet sich leider genausowenig zur Therapiekontrolle wie die Serologie, da mit der PCR nicht zwischen toten und lebenden Erregern unterschieden werden kann. Es ist jedoch bekannt, dass nach einiger Zeit, tote Mikroorganismen vom Körper resorbiert werden, so dass mit einem gewissen Sicherheitsabstand zur Therapie, eine PCR im Krankheitsverlauf durchgeführt werden kann. Zur PCR sind wie oben bereits erwähnt auch andere Zielbereiche geeignet, wie z.B. das *flagellin*-Gen oder das p66-Gen, allerdings bleibt dabei fraglich, ob die Heterogenität des *ospA*-Gens durch Amplifikation eines anderen Genabschnitts erfasst wird und ob es damit überhaupt möglich ist, durch Auswahl einer anderen PCR alle Borrelien-Spezies zu unterscheiden. Je nach Zielstellung der gewünschten Untersuchungen zum Nachweis des Erregers und/oder zur genaueren Speziesinteilung ist es zweckmäßig, ein geeignetes Verfahren auszuwählen.

Diskussion

B. garinii *ospA* Typ 6 konnte mit dieser Studie als dominierende Spezies im Thüringer Naherholungsgebiet Zeitzgrund detektiert werden. Für diese Spezies wird aktuell eine Assoziation zur Neuroborreliose diskutiert (Wilske et al. 1996), müssen nachfolgend Untersuchungen von Borreliose-Patienten dieser Region folgen. Dabei ist die Frage besonders interessant, ob auch in den Patientenproben *B. garinii* Serotyp 6 die dominierende Spezies darstellt und ob diese Thüringer Region damit besonders für die Neuroborreliose endemisch ist. Als Patientenmaterialien eignen sich zum Erregernachweis Gelenk- und Hautbiopsate sowie Liquor, keinesfalls aber Urin oder Blut (Wilske et al. 2000), denn die Borreliose-Erreger befinden sich nur kurzzeitig im Blutkreislauf. Die Urin-PCR wird laut MIO 2/2000 nicht empfohlen (Wilske et al. 2000), da es keine geeigneten standardisierten und evaluierten Protokolle gibt und die Sensitivität in einigen Studien als zu gering beschrieben wurde (Rauter und Hartung 2005).

Nicht nur die diagnostischen Methoden müssen überarbeitet werden, auch im Hinblick auf die Entwicklung einer Borreliose-Schutzimpfung besteht noch Forschungsbedarf. Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine sind monoklonale Mausantikörper gegen die Proteine *ospA* und *ospC* gerichtet (Wilske et al. 1996). *ospC* wird während der Blutmahlzeit hochreguliert und ist entscheidend für die Vektorausbreitung und Infektiosität. Bei der Übertragung der Borrelien auf den Menschen scheint der neue Wirt individuell die Expression von *ospA* und/oder *ospC* zu induzieren. Für eine Impfprophylaxe sind noch weitere Untersuchungen zur Dynamik der Expressionsmechanismen der Borrelien-*osp*-Proteine, aber auch über variable Expressionen von Proteinen der Zecken während der Blutmahlzeit erforderlich (Wilske et al. 1992, Wilske et al. 1993, Wilske et al. 1996). In Amerika gestaltete sich die Impfstoffentwicklung leichter, da dort nur die Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto vertreten ist und dort keine so eine ausgeprägte Spezies- und *osp*-Heterogenität zu bestehen scheint (Rauter und Hartung 2005, Fingerle et al. 2008). Allerdings musste auch dort der bereits verfügbare Impfstoff LymeVax wegen fehlendem Absatz und Spekulationen über Nebenwirkungen vom Markt genommen werden. Es bleibt daher abzuwarten, was die nächsten Jahre hinsichtlich der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffs mit sich bringen.

7.2 Babesien

7.1 Prävalenz

In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Gesamtprävalenz von 5,0% (50/1000) in *Ixodes ricinus* Zecken für Babesien in Mittelthüringen ermittelt werden, wobei diese jährlichen Schwankungen unterliegen zu sein scheint. So betrug die Infektionsrate im Zeitgrund/Stadtroda im Jahr 2006: 7,9% und 2007: 2,0%. Die ermittelten Ergebnisse sind demnach in Thüringen deutlich höher als bisher angenommen. Es gibt bis jetzt nur wenige publizierte, epidemiologische Daten für Europa und insbesondere für Deutschland. Die bisher in nur zwei Regionen Deutschlands (Westen und Süden Deutschlands) ermittelte Babesienprävalenz in Zecken beträgt nach Untersuchungen von Hunfeld und Hartelt circa 1% (Hunfeld et al. 2002, Hartelt et al. 2004). In Polen und Slowenien konnten Babesien in Zecken in Häufigkeiten von 9,6-16,3% nachgewiesen werden (Duh et al. 2001, Skotarczak und Cichocka 2001). In der Studie von Blaschitz et al., 2008 konnten ungewöhnlich hohe Babesienprävalenzen in Zecken von 51% nachgewiesen werden. Weitere epidemiologische Daten aus den potenziellen Vektoren- *Ixodes ricinus* liegen für Europa bisher leider nicht vor. Nur eine einzige Seroprävalenzstudie ist bis heute aus Deutschland bekannt geworden. Dabei konnte eine Seroprävalenz von 1,7% in gesunden Blutspendern nachgewiesen werden und von 11,4% in Personen, die sich an einen Zeckenstich erinnern konnten (Hunfeld et al. 2002). In einer anderen seroepidemiologischen Studie sind Prävalenzen für Europa von 4-13% beschrieben (Granström 1997). Aus Schweden konnten bei einer Untersuchung von Borreliosepatienten 13% Seropositive detektiert werden, wobei eine Arbeit aus Frankreich auch eine Durchseuchung von asymptomatischen Personen in 0,5% der Fälle vermuten lässt (Gorenflot et al. 1987, Uhnou et al. 1992). Die ermittelten Seroprävalenzen für Deutschland stehen im Einklang zu veterinärmedizinischen Untersuchungen dieser Region, so konnte Metz eine Seroprävalenz von 15% für *B. microti* in Hunden nachweisen (Metz 1999). In der Tiermedizin ist die Bedeutung der Babesiose

Diskussion

als zoologische Krankheit und ihre Übertragung durch Zecken der *Ixodes* Art schon lange unumstritten. Schon 1893 publizierte Theobald Smith mit seinem Kollegen F.L. Kilbourne eine grundlegende Arbeit, in der er den Erreger des Texas-Cattle-Fever, *Babesia bigemina* und die Rolle der Zecken bei der Übertragung dieser Krankheit beschrieb (Smith und Kilbourne 1893, Assadian und Stanek 2002). Erst das gehäufte Auftreten von humanen Babesiose-Fällen im Osten Nord-Amerikas lenkte die Aufmerksamkeit der Humanmediziner auf diese kleinen Piroplasmen (Healy et al. 1976, Dammin et al. 1981, Telford et al. 1993). In diesen Fällen konnten meist *B. microti*-Stämme nachgewiesen werden. In Europa hingegen waren nur Fälle von *B. divergens* (besonders bei splenektomierten Patienten) bekannt geworden. Gorenflot et al. beschrieben in einem 1998 publizierten Artikel, dass seit 1950 circa 29 Fälle humaner Babesiose aus Europa bekannt geworden sind, wobei in 22 Fällen *B. divergens* nachgewiesen werden konnte (Gorenflot et al. 1998). Die meisten Fallberichte stammten bis zu diesem Zeitpunkt aus Frankreich und von den britischen Inseln (Hildebrandt et al. 2008). Es ist interessant, dass zehn Jahre nach Erscheinung dieses Artikels nur von ca. 10 weiteren Fällen berichtet wurde und diese Berichte besonders aus Regionen stammen, in denen die Krankheit vorher nicht vertreten schien (Hildebrandt et al. 2008). Die Fallberichte stammen aus Ländern wie z.B. Tschechien, Dänemark, Italien, Portugal, Schweiz, Österreich und Deutschland (Enemark und Petersen 1998, Herwaldt et al. 2002, Nohynkova et al. 2003, Centeno-Lima et al. 2003, Baumann et al. 2003, Corpelet et al. 2005, Moreno Gimenez et al. 2006, Haeselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2007). Die Diagnosestellung in diesen Fällen basierte meist auf dem Giemsa-gefärbten Blutaussstrich, was keine Garantie für die korrekte Speziesermittlung darstellt (Hildebrandt et al. 2008). So ist es also nicht verwunderlich, dass in aktuellen Fallberichten, in welchen zur Diagnosestellung molekularbiologische Analysen zur Anwendung kamen, auch bisher für Europa unentdeckte Spezies gefunden werden konnten (Herwaldt et al. 2002, Hunfeld et al. 2002, Conrad et al. 2006, Haeselbarth et al. 2007, Hildebrandt et al. 2007). Durch diese wenigen Studien kann leider noch keine generelle Aussage über die Babesien-Prävalenz und dem davon ausgehenden Risiko in Deutschland getroffen werden. Auch die Frage, ob Babesien regional flächendeckend und saisonal schwankend oder eher endemisch vorkommen,

bleibt ungeklärt. Die vorliegende Arbeit liefert dabei erste Anhaltspunkte. Es besteht allerdings weiterhin epidemiologischer und seroepidemiologischer Untersuchungsbedarf.

7.2.2 Typisierung

In der Prävalenz von *B. microti* (28/1000) und *B. divergens* (20/1000) konnten in dieser Studie kaum Unterschiede festgestellt werden. Zwei Isolate konnten in der Sequenzierung nicht eindeutig einer dieser beiden Spezies zugeordnet werden und wurden als *Babesia* spp. bezeichnet. Im Gegensatz dazu wurde in Süddeutschland wesentlich häufiger der Subtyp *B. divergens* (28/3113) in babesieninfizierten Zecken identifiziert. *B. microti* konnte in dieser süddeutschen Studie nur in 3 der 3113 gesammelten Zecken nachgewiesen werden (Hartelt et al. 2004). Das alte Dogma, dass Infektionen in Amerika nur durch *B. microti* und Infektionen in Europa nur durch *B. divergens* verursacht werden, muss verlassen werden (Hunfeld et al. 2008). Die diagnostischen Methoden sind meist veraltet. Erst die vollständige Aufschlüsselung des 18S-rRNA-Gens der Babesien brachte etwas Ordnung in die phylogenetische Speziesvielfalt mit über 100 Babesienarten (Hunfeld et al. 2008). Die einzelnen Spezies weisen in ihrem 18S-rRNA-Gen nur geringfügige Unterschiede auf, so dass auch in dieser Thüringer Studie mittels PCR nicht zwischen Babesien-Untergruppen wie z.B. der *Babesia microti*-Gruppe oder der *Babesia ovis-like*-Gruppe differenziert werden konnte. So ist es möglich, dass bei den als *B. divergens* bezeichneten Spezies auch der humanpathogene Stamm *B. divergens* EU1 oder ein anderer *Babesia divergens*-like Organismus enthalten sein könnte. Bis zum heutigen Tag sind bisher folgende zum Teil humanpathogenen Spezies beschrieben und können eine Ursache für die Infektionskrankheit Babesiose beim Menschen darstellen (Hunfeld et al. 2008):

- *Babesia divergens* und *divergens-like* (dazu gehören: *Babesia divergens* ss, *Babesia venatorum* (EU1) und MO1)
- *Babesia ovis-like* (dazu gehören KO1, *Babesia bovis*, *Babesia canis*)
- *Babesia microti* und *microti-like* (dazu gehören: *Babesia microti*-complex)
- *Babesia duncani* und *duncani-like*

7.2.3 Ausblick

Die Zahl der auftretenden Babesienfälle steigt stetig. Mittlerweile sind ca. 39 Fälle aus Europa bekannt geworden (Hunfeld et al., 2008). Dies könnte auf die ständig wachsende Zahl immunkomprimierter, chemotherapeutisch behandelter und AIDS-kranker Patienten zurückgeführt werden. Besonders bei diesen Patienten, aber auch nach operativer Milzentfernung, sollte bei unklaren Infektionszeichen wie z.B. grippeähnlichen Symptomen bis hin zu hohem Fieber und Organversagen an eine Infektion mit Babesien gedacht werden. Giemsa gefärbte Blutaussstriche sind diagnostisch nur in endemisch verdächtigen Regionen von großer Bedeutung, denn nicht in allen Fällen humaner Babesiose kann dieser Test Aufschluss geben z.B. bei einer intermittierenden Parasitämie. Die Parasitämie kann in einem frühen Stadium unter 1% liegen (Krause et al. 1998, Homer et al. 2000) und auch bei der automatisierten Blutbildauswertung kann die Diagnose Babesiose übersehen werden. Die zukünftige Diagnostik einer Babesieninfektion muss also noch deutlich verbessert werden und es müssen zuverlässige Testmethoden wie z.B. IFAT (Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörper-Test) und PCR zur Anwendung kommen. Einen guten Ansatz dafür liefert die PCR des 18S-rRNA-Gens des Babesiengens. In den vorliegenden Untersuchungen traten bei diesem Verfahren allerdings durch die Wahl der Primer vermehrt unspezifische Banden auf. Die Auswertung einer potentiellen Infektion wurde dadurch deutlich erschwert. Das PCR-Protokoll sollte in einer nachfolgenden Arbeit noch weiter optimiert werden. Eventuell ist dafür auch die Auswahl eines anderen Primerpaares erforderlich. Andere wichtige Ansätze könnten in der Anwendung von IFA, Antikörpernachweisen, ELISA oder Immunoblots liegen und sollten auch mikrobiologischen Routinelaboren zur Verfügung stehen. Es wurde auch der Einsatz einer 'Reverse transcription' (RT)-PCR diskutiert, bei der spezifische RNA-Targets in komplementäre DNA-Stränge umgeschrieben werden und dann mittels konventioneller PCR amplifiziert werden (Hildebrandt et al. 2008). Diese Methode verspricht höhere Sensitivität, wenn viele RNA-Kopien des spezifischen DNA-Targets in der Patientenprobe enthalten sind. Die molekularbiologischen Verfahren und Möglichkeiten für einen effektiven Erregernachweis sind damit noch lange nicht ausgeschöpft und es sollten noch

weitere klinische und epidemiologische Studien zur Problematik der Babesiose erfolgen. Auch im Hinblick auf eine Babesiose-Prophylaxe sollte noch wichtige Forschungsarbeit geleistet werden. Es besteht die Notwendigkeit zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen Babesien bei gefährdeten immunsupprimierten und splenektomierten Patienten und die Notwendigkeit zur Etablierung zuverlässiger Screeningmethoden, denn auch bei einer Blutübertragung kann es zur Infektion mit Babesien kommen und die meisten Zeckenstiche werden oft übersehen (Hunfeld und Brade 2004, Leiby 2006, Hildebrandt et al. 2008).

7.3 Koinfektionen

7.3.1 Prävalenzen

Bei einem Zeckenstich ist nicht nur die Übertragung einer einzelnen Infektionskrankheit möglich. Es wird weltweit vom Vorkommen von Mischinfektion mit mehreren Erregern sowohl in Zecken (Baumgarten et al. 1999, Fingerle et al. 1999, Hartelt et al. 2004, Piccolin et al. 2006) als auch in menschlichen Blutproben (Hunfeld und Brade 1999, Oehme et al. 2002, Hermanowska-Szpakowicz et al. 2004) berichtet. Auch in dieser Arbeit wurden Koinfektionen mit den verschiedenen Erregern: Borrelien des *Borrelia burgdorferi* s.l.-Komplexes, Babesien., Anaplasmen und Rickettsien in *Ixodes ricinus* Zecken gefunden. Im Vergleich der Koinfektionsraten von Zecken mit Borrelien/Babesien zeigten sich Werte von 0,5% in Italien (Piccolin et al. 2006) bis maximal 19% in Nantucket Island bei Massachusetts (Belongia 2002). Im Zeitgrund waren 16 Zecken (1,6%) mit diesen beiden Erregern koinfiziert. Beim Vergleich der Raten des gemeinsamen Vorkommens von Borrelien/Rickettsien konnten in China Raten von 2% ermittelt werden (Huang et al. 2006) und im Zeitgrund 4% (40/1000). Dies stellt die höchste Koinfektionsrate der vorliegenden Untersuchungen dar und lässt sich durch die bereits hohen Prävalenzen von Borrelien und Rickettsien als Einzelinfektionen erklären. In der Literatur wird auch von koinfizierten Zecken mit

Borrelien/Anaplasmen berichtet. So beschreiben Nieto und Foley in ihrer Metaanalyse das Vorkommen dieser Erregerkombination in 28% der untersuchten Zecken (Nieto und Foley 2008). In Süddeutschland konnten Baumgarten et al. in Zecken von Hunden und Rehen (Baumgarten et al. 1999) und Fingerle et al. 1999 in nüchternen Zecken, Koinfektionen von *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* sensu lato nachweisen (Fingerle et al. 1999). Fingerle et al. fanden diese Doppelinfektionen dabei ausschließlich in adulten Zecken. Auch in der vorliegenden Studie konnten Mischinfektionen von Bbsl und Anaplasmen besonders in adulten Zecken (11/16) nachgewiesen werden.

7.3.2 Bewertung

Verschiedene Seroprävalenzstudien berichten über hohe Koinfektionsraten von bis zu 39% bei Patienten mit akuten durch Zecken übertragenen Infektionskrankheiten (Belongia 2002). Dabei scheint besonders das kombinierte Auftreten von Babesien und Borrelien von Bedeutung zu sein. In den USA ist diese Kombination in 80% aller Koinfektionen vertreten (Belongia 2002). Dies sollte bei der Klinik und Diagnostik dieser Infektionskrankheiten berücksichtigt werden. Eine positive Borrelien-Serologie schließt demnach weitere durch Zecken übertragene Infektionskrankheiten nicht aus. Neue zuverlässige diagnostische Methoden sollten entwickelt und standardisiert werden. Ein erster Ansatz könnte dabei die Etablierung einer spezifischen PCR sein. Es gibt bereits Ansätze einer multiplex-PCR, mit der mehrere durch Zecken übertragene Krankheiten gleichzeitig, d.h. mit nur einer PCR erfasst werden können (Courtney et al. 2004, Sirigireddy et al. 2006, Tokarz et al. 2008).

7.4 Kritische Schlussbetrachtung der eigenen Methoden

Die Sekundärampifikation ('semi-nested' PCR) zum Nachweis des Borrelien *ospA*-Gens mit anschließender RFLP-Analyse (Michel et al. 2004) eignete sich besonders gut zum Nachweis der 5 verschiedenen Borrelien-Spezies: *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*. Auch zwischen den einzelnen *B. garinii* OspA-Typen konnte differenziert werden und es war

Diskussion

außerdem möglich, Doppelinfektionen mit mehr als einem Subtyp des Bbsl-Komplexes zu erfassen. Allerdings war die Differenzierung zwischen den Spezies *B. garinni* Typ 6/*B. garinii* Typ 8 und *B. valaisiana* „subgroup II“/*B. spielmanii* erst nach Anschluß eines Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xba*I möglich, wie bereits von Lencakova beschrieben (Lencakova et al. 2006). Bei dieser Methode sollte allerdings bedacht werden, dass nicht zwischen Doppel- und Mehrfachinfektionen mit diesen Spezies differenziert werden kann. So sieht das Restriktionsbild einer Doppelinfektion mit *B. valaisiana* subgroup I/subgroup II genauso aus, wie eine Dreifachinfektion mit *B. valaisiana* subgroup I/subgroup II und der Genospezies A14S. Eine Klonierung und anschließende Sequenzierung würde leider auch keine Dreifachinfektion aufzeigen, da durch die Sequenzierung in diesem Fall überlagerte Banden entstehen. Die einzige Möglichkeit ist es, in diesem Fall vielleicht die Restriktion weiter zu optimieren oder vielleicht zusätzlich genetische Unterschiede in einem anderen Bereich, d.h. ausserhalb des *ospA* Gens zu finden. Eine Klonierung und anschließende Sequenzierung ist eventuell dann realisierbar, wenn man zwischen 30 und 50 verschiedene Klone sequenzieren würde, was sehr zeit- und kostenintensiv ist.

Der Nachweis von *Babesia* spp. mit Hilfe der in dieser Arbeit zuerst verwendeten PCR, über Amplifikation des 284 bp langen 18S-rRNA-Gen-Abschnittes, erwies sich nicht als optimal. Es traten viele unspezifische Banden auf, die die Unterscheidung zwischen positiv und negativ deutlich erschwerten. Der folgende Restriktionsverdau mit dem Enzym *Alu*I gestaltete sich von einigen Proben ebenfalls als schwierig auswertbar, da die vielen unsicheren Proben der PCR im Verdau erneut unsicher erschienen. Es wurden etwa 100 von den 1000 untersuchten Proben als fraglich klassifiziert, so dass nachfolgend eine zweite PCR mit anderen Primern zur Anwendung kam. Dabei wurde über die Amplifikation eines 582 bp großen Abschnitt des 18S-rRNA-Gens gearbeitet. Diese PCR erwies sich als sehr spezifisch, es traten kaum unspezifische banden auf. Zur Speziesklassifikation der Babesien wurden alle als positiv bewerteten Proben sequenziert. Es konnten dabei nur die beiden Haupt-Spezies *B. microti* und *B. divergens* unterschieden werden. Es ist allerdings möglich, dass einige als *B. divergens* klassifizierte Proben den

humanpathogenen Stamm *B. divergens* EU1 bzw. einen anderen *divergens-like*-Stamm beherbergen.

7.5 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit ist die erste epidemiologische Arbeit zur gleichzeitigen Analyse der Borrelien- und Babesienprävalenz in Thüringen. Bisher gibt es deutschlandweit nur sehr wenige Daten besonders über die Babesienprävalenz und auftretende Koinfektionen mit Borrelien. Die ermittelten Daten liefern einen wichtigen Beitrag zur Risikobewertung im Untersuchungsgebiet, da sehr hohe Prävalenzen von *B. burgdorferi* sensu lato (27,0%) und *Babesia* spp. (5,0%) für die gesammelten *I. ricinus* Zecken ermittelt werden konnten. Das gewählte Naherholungsgebiet gilt als ein von Mensch und Tier häufig frequentiertes Gebiet. Neben den Prävalenzdaten im Vektor bedarf es zur aussagekräftigen Risikoeinschätzung aber auch Daten zur Inzidenz, sowie umfangreiche seroepidemiologische Studien von Menschen und potenziellen Wirtstieren. Die epidemiologischen Studien sollten auch deutlich erweitert werden und über einen Verlauf von mehreren Jahren erfolgen, um Fluktuationen zwischen den einzelnen Untersuchungsjahren zu erkennen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die Prävalenzen über einen Verlauf von zwei Jahren ermittelt. Für Borrelien ist eine relativ stabile Prävalenz zwischen den Untersuchungsjahren zu erkennen (2006:27,1%/2007:26,9%) bei den Babesien schwankt diese allerdings deutlich (2006:7,9%/2007:2,0%). In der vorliegenden Untersuchung wurden allerdings in den Wintermonaten keine *Ixodes ricinus* Zecken gesammelt. Interessant ist aber auch die Frage nach dem jahreszeitlichen Verlauf der Infektionsraten. In der kalten Jahreszeit ist allerdings das Risiko für die Bevölkerung einen Zeckenstich zu erleiden reduziert, da die Freizeitaktivitäten in den Wintermonaten meist auf Innenraumsportarten verlagert werden. Auch durch das RKI (Robert-Koch-Institut, 2008) wird ein Inzidenzgipfel des Erythema migrans- dem Hauptsymptom einer Borrelieninfektion- in den Sommermonaten Mai bis August angegeben (Abb. 7.5.1).

Diskussion

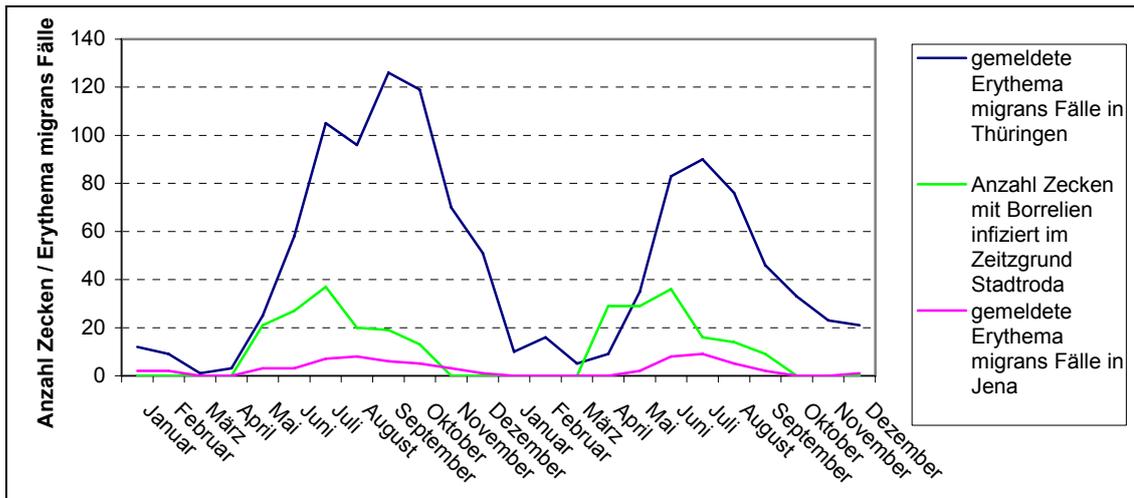


Abb. 7.5.1 gemeldete Erythema migrans Fälle in Thüringen und Jena 2006 und 2007

Es ist zu erkennen, dass die gemeldeten Erythema migrans Fälle den Häufigkeitsgipfel nach dem Peak der in dieser Studie ermittelten Borrelieninfektionen erreichen. (Quelle: gemeldete Erythema migrans Fälle: Robert-Koch-Institut, 2008)

Die Aufmerksamkeit sollte jedoch auch auf Risikopersonen wie z.B. Waldarbeiter, Freizeitsportler und Immunsupprimierte gelenkt werden. Bei diesen Personengruppen sollte über generelle Screeningverfahren nachgedacht werden, da z.B. Babesieninfektionen klinisch stumm verlaufen können, jedoch die Möglichkeit einer Infektion bei Blutübertragungen besteht (Hunfeld et al. 2002). Dieser Sachverhalt kann besonders für immunsupprimierte Patienten einen tragischen Ausgang nehmen, wie auch der erste autochthone *Babesia microti*-Fall Europas aufzeigt (Hildebrandt et al. 2007). Diese Fallbeschreibung stammt aus dem Bundesland Thüringen, was Anlass zu epidemiologischen Untersuchungen in diesem Gebiet mit dieser Studie war. Besonders die gegenwärtige Präsenz des Erregers der Babesiose sollte dabei beleuchtet werden. Leider besteht zum derzeitigen Zeitpunkt noch keine Möglichkeit zur Durchführung genereller Screeningverfahren bei Blutspendern, da weder standardisierte PCR-Protokolle noch ausreichend evaluierte serologischen Verfahren zur Verfügung stehen. Bezüglich der Erforschung der Borreliose wurden in den letzten Jahrzehnten sehr viele Daten gesammelt, allerdings gibt es in der Diagnostik wenig Neuerungen und noch immer keine standardisierte oder kommerziell erhältliche PCR. Dies könnte am Problem der großen Speziesvielfalt und der deutlich ausgeprägten *ospA*-Gen-Heterogenität

liegen. Auch für die Untersuchungsregion Thüringen konnte mit dieser Studie die Speziesvielfalt und Gruppenheterogenität des *Borrelia burgdorferi* s.l.-Komplexes belegt werden. Alle bisher bekannten *Borrelia*-Spezies konnten in unterschiedlicher Häufigkeit ermittelt werden. Besonders dominierend waren dabei die Spezies *B. garinii* (133/270) v.a. OspA-Serotyp 6 (66/270), gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto (70/270), *B. afzelii* (42/270) und *B. valaisiana* (28/270), aber auch die wesentlich seltener vorkommenden Spezies *B. lusitaniae* (1/270), *B. valaisiana* „subgroup II“ (2/270) und *B. spielmanii* (3/270) konnten detektiert werden. Doppelinfektionen der Zecken mit mehr als einem Borrelien-Subtyp konnten in 14 von 1000 untersuchten Zecken gefunden werden, somit ist auch das Auftreten von Doppelinfektionen in Patientenmaterialien möglich und sollte bei klinischen und epidemiologischen Fragestellungen berücksichtigt werden. In der Literatur (Stricker et al. 2003, Yoshinari et al. 2003, Meer-Scherrer et al. 2004) ist beschrieben, dass Babesien häufig gemeinsam mit Borrelien übertragen werden und auch das Auftreten von Koinfektionen mit den Erregern Anaplasmen, Rickettsien, Babesien und Anaplasmen stellt in der Klinik eine gewisse Problematik dar. Eine positive Borrelien-Serologie schließt das Vorhandensein anderer Erreger nicht aus, daran wird bei der klinischen Diagnosestellung jedoch oft nicht ausreichend gedacht. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Koinfektionen von Borrelien/Rickettsien (40/1000), gefolgt von Rickettsien/Babesien (19/1000) ermittelt. Das gemeinsame Auftreten von Borrelien/Babesien (16/1000) und Borrelien/Anaplasmen (16/1000) scheint jedoch auch in Thüringen bedeutsam zu sein. Diese Koinfektionen sollten im Hinblick auf die Entwicklung einer erfolgreichen Vakzine gegen diese bedeutenden durch Zecken übertragenen Infektionskrankheiten berücksichtigt werden. So ist bereits die Entwicklung eines generellen Zeckenimpfstoffes gegen im Speichel der Zecke enthaltene Stoffe in Arbeit (Jittapalapong et al. 2008), wobei allerdings fraglich bleibt, ob dies die Übertragung von Erregern generell verhindern kann. Weitere Untersuchungen sind dazu unbedingt nötig.

Literaturverzeichnis

- Adkins S, Burmeister M. 1996. Visualization of DNA in agarose gels as migrating colored bands: applications for preparative gels and educational demonstrations. *Anal Biochem*, 240 (1):17-23.
- Afzelius A. 1910. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. 16. Dezember 1909. *Arch Dermatol Syph*, 101 (1910):405-406.
- Alekseev AN, Dubinina HV, Van De Pol I, Schouls LM. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ticks* in the Baltic regions of Russia. *J Clin Microbiol*, 39 (6):2237-2242.
- Appelhans H, Flachmann R, Frey A, Fuchs R, Gassen HG, Guddat U, Hahn H, Heilmann H-J, Jany K-D, Kahnt B, Köhler S, Kriechbaum M, Labitzke R, Lachmund A, Lenz E, Manns A, Meckelein B, Nguyen Quoc K, Papandropoulou A, Pieler T, Sachse G, Stollwerk J, Weber-Schaeuffelen M, Wildhardt G, Wirsal S, Wollny H-E, Zinke H. 1991. *Gentechnische Methoden- Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Aufl. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, Hrsg: S. Bertram, H.G. Gassen.
- Assadian O, Stanek G. 2002. Theobald Smith--the discoverer of ticks as vectors of disease. *Wien Klin Wochenschr*, 114 (13-14):479-481.
- AWMF. 2005. *Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie (S2)*. 3.te Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Babes V. 1888. Sur l'hémoglobulinurie bacterienne du boeuf. *Compt. Rend Acad Sci, Ser. III Sci. Vie.* (107):692-694.
- Balmelli T, Piffaretti JC. 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol*, 146 (4):329-340.
- Baranton G, Postic D, Saint Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, 42 (3):378-383.
- Barbour AG, Hayes SF. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*, 50 (4):381-400.
- Baumann D, Pusterla N, Peter O, Grimm F, Fournier PE, Schar G, Bossart W, Lutz H, Weber R. 2003. Fever after a tick bite: clinical manifestations and diagnosis of acute tick bite-associated infections in northeastern Switzerland. *Dtsch Med Wochenschr*, 128 (19):1042-1047.
- Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic *ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *J Clin Microbiol*, 37 (11):3448-3451.
- Belongia EA. 2002. Epidemiology and impact of coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2 (4):265-273.
- Blaschitz M, Narodoslavsky-Gfoller M, Kanzler M, Stanek G, Walochnik J. 2008. *Babesia* species occurring in Austrian *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 74 (15):4841-4846.

- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216 (4552):1317-1319.
- Burgdorfer W. 1986. Discovery of the Lyme disease spirochete: a historical review. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 263 (1-2):7-10.
- Centeno-Lima S, do Rosario V, Parreira R, Maia AJ, Freudenthal AM, Nijhof AM, Jongejan F. 2003. A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Trop Med Int Health*, 8 (8):760-764.
- Conrad PA, Kjemtrup AM, Carreno RA, Thomford J, Wainwright K, Eberhard M, Quick R, Telford SR, 3rd, Herwaldt BL. 2006. Description of *Babesia duncani* n.sp. (*Apicomplexa: Babesiidae*) from humans and its differentiation from other piroplasms. *Int J Parasitol*, 36 (7):779-789.
- Corpelet C, Vacher P, Coudore F, Laurichesse H, Conort N, Souweine B. 2005. Role of quinine in life-threatening *Babesia divergens* infection successfully treated with clindamycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24 (1):74-75.
- Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, 42 (7):3164-3168.
- Damaerschallck I, Benmessaoud A, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E. 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol*, (33):602-608.
- Dammin GJ, Spielman A, Benach JL, Piesman J. 1981. The rising incidence of clinical *Babesia microti* infection. *Hum Pathol*, 12 (5):398-400.
- Dorn W, Messutat S, Kipp S, Feldmann A, Sünder U. 1999. Seasonal variations in the infestation of rodents with *Ixodes ricinus* Linnaeus (*Acar: Ixodidae*) and prevalence of *Borrelia* infections in a habitat of the IIm-Valley (Thuringia, Germany). *Zentbl Bakteriol*, 289:696-697.
- Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. 2001. Diversity of *Babesia* Infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol*, 39 (9):3395-3397.
- Eckert J, Friedhoff K, Zahner H, Deplazes P. 2005. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Aufl. Enke Verlag in MVS Medizinverlag Stuttgart GmbH & Co.
- Enemark H, Petersen JE. 1998. Babesiosis in Denmark. *Ugeskr Laeger*, 160 (43):6225.
- Faulde M, Uedelhoven W. 2006. A new clothing impregnation method for personal protection against ticks and biting insects. *Int J Med Microbiol*, 296 Suppl 40:225-229.
- Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. 1995. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol*, 33 (7):1867-1869.
- Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. 1999. Coexistence of *ehrlichiae* of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol*, 188 (3):145-149.
- Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B. 2000. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol*, 189 (2):59-66.

Literaturverzeichnis

- Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol*, 298 (3-4):279-290.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wattney L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390 (6660):580-586.
- Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol*, 40 (11):877-881.
- Gern L, Humair PF. 1998. Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Wien Klin Wochenschr*, 110 (24):856-858.
- Gorenflot A, Bazin C, Ambroise-Thomas P. 1987. Human babesiosis. Treatment of severe forms. *Presse Med*, 16 (22):1099.
- Gorenflot A, Moubri K, Precigout E, Carcy B, Schetters TP. 1998. Human babesiosis. *Ann Trop Med Parasitol*, 92 (4):489-501.
- Granström M. 1997. Tick-borne zoonoses in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 3 (2):156-169.
- Gray JS. 1991. The development and seasonal activity of the tick, *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol* 79:323-333.
- Gray JS, Kirstein F, Robertson JN, Stein J, Kahl O. 1999. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp Appl Acarol*, 23 (9):717-729.
- Haeselbarth K, Tenter AM, Brade V, Krieger G, Hunfeld KP. 2007. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol*, 297 (3):197-204.
- Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, 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. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37:86-92.
- Healy GR, Spielman A, Gleason N. 1976. Human babesiosis: reservoir in infection on Nantucket Island. *Science*, 192 (4238):479-480.
- Hellenbrand W, Poggensee G. 2007. Zecken auf dem Vormarsch: Borreliose und FSME im Gepäck. *Berliner Ärzte* 5/2007:S.15-21.
- Hermanowska-Szpakowicz T, Skotarczak B, Kondrusik M, Rymaszewska A, Sawczuk M, Maciejewska A, Adamska M, Pancewicz S, Zajkowska J. 2004. Detecting DNAs of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* in the blood of patients suspected of Lyme disease. *Ann Agric Environ Med*, 11 (2):351-354.
- Herwaldt BL, Neitzel DF, Gorlin JB, Jensen KA, Perry EH, Peglow WR, Slemenda SB, Won KY, Nace EK, Pieniazek NJ, Wilson M. 2002. Transmission of *Babesia microti* in Minnesota through four blood

- donations from the same donor over a 6-month period. *Transfusion*, 42 (9):1154-1158.
- Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, Homer M, Lofy KH, Slemenda SB, Fritsche TR, Persing DH, Limaye AP. 2004. *Babesia divergens*-like infection, Washington State. *Emerg Infect Dis*, 10 (4):622-629.
- Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V. 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 22 (6):364-367.
- Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26 (8):595-601.
- Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP. 2008. Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? *Int J Med Microbiol*, 298:336-346.
- Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford SR, 3rd, Krause PJ, Persing DH. 2000. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 13 (3):451-469.
- Huang HN, Ding Z, He J, Wu XM, Jiang BG, Gao Y, Chu CY, Zhan L, Zhao QM, Wang YF, Cao WC. 2006. Study on the coinfection status of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group *Rickettsia* in ticks from Hunchun, Jilin province. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 27 (5):379-383.
- Hubalek Z, Halouzka J. 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*, 84 (3):167-172.
- Hunfeld KP, Brade V. 1999. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18 (3):221-224.
- Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM. 2002. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol*, 40 (7):2431-2436.
- Hunfeld KP, Brade V. 2004. Zoonotic *Babesia*: possibly emerging pathogens to be considered for tick-infested humans in Central Europe. *Int J Med Microbiol*, 293 Suppl 37:93-103.
- Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol*, 38 (11):1219-1237.
- Jensen PM. 2000. Host seeking activity of *Ixodes ricinus* ticks based on daily consecutive flagging samples. *Exp Appl Acarol*, 24 (9):695-708.
- Jittapalapong S, Phichitrasilp T, Chanphao H, Rerkamnuychoke W, Stich RW. 2008. Immunization with tick salivary gland extracts. *Ann N Y Acad Sci*, 1149:200-204.
- Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM. 1984. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, 57 (4):529-537.
- Jouda F, Crippa M, Perret JL, Gern L. 2003. Distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks of canton Ticino (Switzerland). *Eur J Epidemiol*, 18 (9):907-912.
- Kahl O, Janetzki C, Gray JS, Stein J, Bauch RJ. 1992. Tick infection rates with *Borrelia*: *Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and

- Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. *Med Vet Entomol*, 6 (4):363-366.
- Kahl O. 1994. Die Zecke als Vektor 2. Potsdamer Symposium. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen Hrsg. J. Süß Weller Verlag.
- Kakoma I, Mehlhorn H. 1994. *Babesia* of Domestic Animals. In: J P Kreier (ed), *Parasitic Protozoa Academic Press, San Diego, Calif*, 7 (2nd):141-216.
- Kampen H, Rotzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM. 2004. Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol*, 70 (3):1576-1582.
- Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol*, 37 (11):843-848.
- Kipp S, Goedecke A, Dorn W, Wilske B, Fingerle V. 2006. Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. *Int J Med Microbiol*, 296 Suppl 40:125-128.
- Kirstein F, Rijpkema S, Molkenboer M, Gray JS. 1997. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol*, 63 (3):1102-1106.
- Kjemtrup AM, Conrad PA. 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol*, 30 (12-13):1323-1337.
- Kollmeier M, Hagemann G, Kunze A, Willig V, Straube E, Witte OW. 2002. Problems of differential diagnosis in tick-borne encephalitis-induced polyradiculitis. *Nervenarzt*, 73 (12):1191-1194.
- Krämer A. 2009. Prävalenz von Anaplasmen und Rickettsien im Naherholungsgebiet Zeitgrund in Thüringen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Krause PJ, Spielman A, Telford SR, 3rd, Sikand VK, McKay K, Christianson D, Pollack RJ, Brassard P, Magera J, Ryan R, Persing DH. 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Engl J Med*, 339 (3):160-165.
- Kubiak K, Dziekonska-Rynko J, Jablonowski Z. 2004. Occurrence and seasonal activity of European ticks *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) in the forest areas of Olsztyn. *Wiad Parazytol*, 50 (2):265-268.
- Kubiak K, Dziekonska-Rynko J. 2006. Seasonal activity of the common European tick, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), in the forested areas of the city of Olsztyn and its surroundings. *Wiad Parazytol*, 52 (1):59-64.
- Kurtenbach K, Kampen H, Dizij A, Arndt S, Seitz HM, Schaible UE, Simon MM. 1995. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J Med Entomol*, 32 (6):807-817.
- Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol*, 47 (4):921-925.
- Leiby DA. 2006. Babesiosis and blood transfusion: flying under the radar. *Vox Sang*, 90 (3):157-165.
- Lencakova D, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in

- Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. Int J Med Microbiol, 296 Suppl 40:108-118.
- Leonovich SA. 2004. Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. Exp Appl Acarol, 32 (1-2):89-102.
- Liebisch A. 1991a. Biologie und Ökologie der Zecken. In: Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. 1te Aufl. Horst, H (Hrsg.), perimed- Fachbuch-Verl.-Ges., Erlangen.
- Liebisch A. 1991b. Zeckenborreliose bei Haustieren. In: Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. Aufl. 1. Horst, H (Hrsg.),perimed-Fachbuch-Verl.-Ges. Erlangen
- Liveris D, Gazumyan A, Schwartz I. 1995. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol, 33 (3):589-595.
- Maiwald M, Oehme R, March O, Petney TN, Kimmig P, Naser K, Zappe HA, Hassler D, von Knebel Doeberitz M. 1998. Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. Epidemiol Infect, 121 (1):103-108.
- Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol, 33 (9):2427-2434.
- Meer-Scherrer L, Adelson M, Mordechai E, Lottaz B, Tilton R. 2004. *Babesia microti* infection in Europe. Curr Microbiol, 48 (6):435-437.
- Mermod C, Aeschlimann A, Graf JF. 1973. Ecology and ethology of *Ixodes ricinus* Linne 1758, in Switzerland (*Acarina, Ixodoidea*). 1st report: numerical fluctuations. Acarologia, 15 (2):197-205.
- Metz W. 1999. Einheimische und importierte zeckenübertragene Infektionen bei Hunden in Deutschland Hannover: Tierärztliche Hochschule.
- Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V. 2004. An ospA-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. Med Microbiol Immunol, 193 (4):219-226.
- Milutinovic M, Masuzawa T, Tomanovic S, Radulovic Z, Fukui T, Okamoto Y. 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. Exp Appl Acarol, 45 (3-4):171-183.
- Moreno Gimenez JC, Jimenez Puya R, Galan Gutierrez M, Ortega Salas R, Duenas Jurado JM. 2006. Erythema figuratum in septic babesiosis. J Eur Acad Dermatol Venereol, 20 (6):726-728.
- Nau R, Christen H-J, Eiffert H. 2009. Lyme-Borreliose-aktueller Kenntnisstand. Deutsches Ärzteblatt, Jg.106 (Heft 5/2009):72-81.
- Nieto NC, Foley JE. 2008. Meta-Analysis of Coinfection and Coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. Vector Borne Zoonotic Dis,

- Nilsson A. 1988. Seasonal occurrence of *Ixodes ricinus* (Acari) in Vegetation and on small mammals in southern Sweden. *Holarctic Ecol*, 11:161-165.
- Nohynkova E, Kubek J, Mest'ankova O, Chalupa P, Hubalek Z. 2003. A case of *Babesia microti* imported into the Czech Republic from the USA. *Cas Lek Cesk*, 142 (6):377-381.
- Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P. 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *Int J Med Microbiol*, 291 Suppl 33:22-29.
- Olsen B, Jaenson TG, Bergstrom S. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol*, 61 (8):3082-3087.
- Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G. 2006. A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 6 (1):24-31.
- Poggensee G, Fingerle V, Hunfeld K-P, Kraiczy P, Krause A, Matuschka F-R, Richter D, Simon M, Wallich R, Hofman H, Kohn B, Lierz M, Linde A, Schneider T, Straubinger R, Stark K, Süss J, Talaska T, Jansen A. 2008. Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze-Ergebnisse eines interdisziplinären Expertentreffens am Robert Koch-Institut. Springer Medizin Verlag 2008 Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2008 (51):1329–1339.
- Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G. 1998. Expanded diversity among Californian *borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol*, 36 (12):3497-3504.
- Pretzmann G, Radda A, Loew J. 1964. Studies of a natural focus of the spring-summer meningoencephalitis (tick-borne Encephalitis) in Lower Austria. 5. Additional investigations of the virus circulation in a natural focus. *Zentralbl Bakteriol [Orig]*, 194 (4):431-439.
- Radda A, Burger I, Stanek G, Wewalka G. 1986. Austrian hard ticks as vectors of *Borrelia burgdorferi*, overview. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*, 263 (1-2):79-82.
- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 40 (1):36-43.
- Rauter C, Hartung T. 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol*, 71 (11):7203-7216.
- Rijpkema S, Golubic D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruif N, Schellekens J. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol*, 20 (1):23-30.
- Robert-Koch-Institut. 2007b. Epidemiologisches Bulletin Nr.14 Ein möglicher Vektor: Auwaldzecke – *Dermacentor reticulatus*.
- Robert-Koch-Institut 26.10.2008. Lyme-Borreliose RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten–Merkblätter für Ärzte http://www.rki.de/cln_100/nn_466802/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__LymeBorreliose.html.

Literaturverzeichnis

- Robert-Koch-Institut 26.10.2008. Frühsommer-Meningoenzephalitis RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten–Merkblätter für Ärzte http://www.rki.de/cln_100/nn_467538/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__FSME.html.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T. 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. 5. vollständig neubearbeitete Aufl. Parey Buchverlag Berlin.
- Rufli T, Mumcuoglu Y. 1981. *Ixodidae*, hard ticks. *Argasidae*, soft ticks (author's transl). Schweiz Rundsch Med Prax, 70 (9):362-385.
- Sachse S. 2008. Gelelektrophorese von PCR- Amplifikaten [Arbeitsanweisung]. Medizinische Mikrobiologie Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature, 265 (5596):687-695.
- Schmidt R, Kabatzki J, Hartung S, Ackermann R. 1985. Erythema migrans borreliosis in the Federal Republic of Germany. Epidemiology and clinical aspects. Dtsch Med Wochenschr, 110 (47):1803-1807.
- Schwan TG. 2003. Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. Biochem Soc Trans, 31 (Pt 1):108-112.
- Sirigireddy KR, Mock DC, Ganta RR. 2006. Multiplex detection of *Ehrlichia* and *Anaplasma* pathogens in vertebrate and tick hosts by real-time RT-PCR. Ann N Y Acad Sci, 1078:552-556.
- Skarphedinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sogaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP. 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. Apmis, 115 (3):225-230.
- Skotarczak B, Cichocka A. 2001. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. Ann Agric Environ Med, 8 (2):187-189.
- Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A. 2002. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. Ann Agric Environ Med, 9 (1):25-28.
- Smith T, Kilbourne F. 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of southern cattle fever. Bull 1te Aufl. US Dep Agric Bur Anim Ind.
- Sonenshine DE. 1993. Biology of ticks Oxford University Presse Aufl.1
- Stanczak J, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Lozowska W, Kur J. 2000. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different regions of Poland. Int J Med Microbiol, 290 (6):559-566.
- Stanczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann Agric Environ Med, 11 (1):109-114.
- Stanek G, Hofmann H. 1994. Krank durch Zecken, FSME und Lyme-Borreliose. 1te Aufl. Verlag Wilhelm Maudrich, Wien.
- Stanek G. 2005. Tick-borne pathogens in Central Europe. Wien Klin Wochenschr, 117 (11-12):373-380.

- Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 20 (1):7-17.
- Steil B. 2002. Die genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* L. 1758 in ausgewählten Naturherden Thüringens Jena: FSU Diss.
- Stowell CP, Gelfand JA, Shepard JA, Kratz A. 2007. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 17-2007. A 25-year-old woman with relapsing fevers and recent onset of dyspnoea. *N Engl J Med*, 356 (22):2313-2319.
- Stricker RB, Gaito A, Harris NS, Burrascano JJ. 2003. Coinfection in patients with lyme disease: how big a risk? *Clin Infect Dis*, 37 (9):1277-1278; author reply 1278-1279.
- Süss J, Zenk T. 1993. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen. Verlag IMMUNO GmbH Heidelberg.
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld KP, Schrader C, Wilske B. 2004. Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part II: Bacteria, parasites and mixed infections. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 47 (5):470-486.
- Süss J, Schrader C. 2004a. Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa Teil I: Zecken und Viren. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, (47):392-404.
- Süss J, Schrader C. 2004b. Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part I: Ticks and Viruses. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*, 47 (4):392-404.
- Taragel'ova V, Koci J, Hanincova K, Kurtenbach K, Derdakova M, Ogden NH, Literak I, Kocianova E, Labuda M. 2008. Blackbirds and song thrushes constitute a key reservoir of *Borrelia garinii*, the causative agent of borreliosis in Central Europe. *Appl Environ Microbiol*, 74 (4):1289-1293.
- Telford SR, 3rd, Gorenflot A, Brasseur P, Spielman A. 1993. Babesial infection in human and wildlife. Kreier, JP (Ed) *Parasitic Protozoa*, 5 (Academic Press, San Diego, CA, pp.):1-47.
- Tokarz R, Kapoor V, Samuel JE, Bouyer DH, Briese T, Lipkin WI. 2008. Detection of Tick-Borne Pathogens by MassTag Polymerase Chain Reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis*,
- Tresova G, Pet'ko B, Stanko M, Fricova J, Kozakova D, Mateicka F. 1998. *Borrelia garinii* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Poland. *Folia Parasitol (Praha)*, 45 (1):73-74.
- Uhnöo I, Cars O, Christensson D, Nystrom-Rosander C. 1992. First documented case of human babesiosis in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 24 (4):541-547.
- Vennestrom J, Egholm H, Jensen PM. 2008. Occurrence of multiple infections with different *Borrelia burgdorferi* genospecies in Danish *Ixodes ricinus* nymphs. *Parasitol Int*, 57 (1):32-37.
- Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J. 1997. Genetic and phenotypic analysis of

Literaturverzeichnis

- Borrelia valaisiana* sp. nov. (Borrelia genomic groups VS116 and M19). Int J Syst Bacteriol, 47 (4):926-932.
- Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour AG, Kramer M. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann N Y Acad Sci, 539:126-143.
- Wilske B, Barbour AG, Bergstrom S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R. 1992. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. Res Microbiol, 143 (6):583-596.
- Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J Clin Microbiol, 31 (2):340-350.
- Wilske B. 1993/1994. Infektionen durch *Borrelia burgdorferi* -Lyme Borreliose. Jahrbuch der Dermatologie–Infektion und Haut FRG:127-154.
- Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac Mursic V, Rossler D, Will G. 1996. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. Infection, 24 (2):208-212.
- Wilske B, Fingerle V. 2000. Diagnosis of Lyme borreliosis. How to corroborate suspected borreliosis. MMW Fortschr Med, 142 (15):28-31.
- Wilske B, Zöller L., V. B, Eiffert M, Göbel UB, Stanek G, Pfister HW. 2000. MIQ 12 Lyme-Borreliose. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Urban & Fischer, München-Jena:1-59.
- Yoshinari NH, Abrao MG, Bonoldi VL, Soares CO, Madruga CR, Scofield A, Massard CL, da Fonseca AH. 2003. Coexistence of antibodies to tick-borne agents of babesiosis and Lyme borreliosis in patients from Cotia county, State of Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 98 (3):311-318.
- Zacharias J. 2008. Lyme Borreliose- Das diagnostische und therapeutische Dilemma. 8.te Aufl. Books on Demand.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1.1 Entwicklungszyklus <i>Ixodes ricinus</i>	5
Abb. 4.1.1 Thüringenkarte mit der Lage des Habitates im Zeitgrund.....	21
Abb. 4.1.2 Habitat entlang des Zeitzbaches	22
Abb. 4.4.1 Auszug aus dem <i>ospA</i> Gen von <i>B. valaisiana</i>	27
Abb. 4.4.2 Auszug aus dem 18S rRNA Gen von <i>Babesia microti</i>	30
Abb. 4.7.1 Sequenzausschnitt <i>Babesia microti</i>	38
Abb. 6.1.1 Boxplot DNA-Konzentration.....	44
Abb. 6.2.1 Schaubild Methodenkritik.....	45
Abb. 6.3.1 Borrelien Primäramplifikation und Sekundäramplifikation	47
Abb. 6.3.2 RFLP <i>B. afzelii</i> und <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	48
Abb. 6.3.3 RFLP <i>B. garinii</i> OspA Typ 5 und <i>B. valaisiana</i>	49
Abb. 6.3.4 RFLP <i>B. garinii</i> OspA Typ 6.....	50
Abb. 6.3.5 <i>B. valaisiana</i> „subgroup I“/A14S Mischinfektion	51
Abb. 6.4.1 Borrelien: RFLP Doppelinfektionen (a, b).....	52
Abb. 6.4.2 Borrelien: RFLP Doppelinfektionen (c, d).....	53
Abb. 6.5.1 Babesien PCR-284 bp großes Amplifikat	55
Abb. 6.5.2 Babesien PCR-582 bp großes Amplifikat	55
Abb. 6.5.3 Babesien: Restriktionsverdau mit <i>AluI</i>	56
Abb. 6.6.1 Kreisdiagramm: Anteil Borrelien, Babesien und Koinfektionen	57
Abb. 6.6.2 Überblick Infektionszahlen.....	58
Abb. 6.6.3 Infektionszahlen nach Entwicklungsstadium 2006	59
Abb. 6.6.4 Infektionszahlen nach Entwicklungsstadium 2007	59
Abb. 6.7.1 Borrelien Prävalenz 2006 nach Entwicklungsstadien	63
Abb. 6.7.2 Borrelien Prävalenz 2007 nach Entwicklungsstadien	64
Abb. 6.7.3 Borrelien: Saisonale Prävalenz 2006.....	65
Abb. 6.7.4 Borrelien: Saisonale Prävalenz 2007.....	66
Abb. 6.7.5 Abhängigkeit der Prävalenzen vom Wetter	67
Abb. 6.7.6 Verteilung der Borrelien-Subtypen.....	68
Abb. 6.7.7 Verteilung der <i>B. garinii</i> OspA-Serotypen.....	69
Abb. 6.8.1 Babesien: Prävalenz 2006 nach Entwicklungsstadien	74
Abb. 6.8.2 Babesien: Prävalenz 2007 nach Entwicklungsstadien	74
Abb. 6.8.3 Babesien: Saisonale Prävalenz 2006.....	75
Abb. 6.8.4 Babesien: Saisonale Prävalenz 2007	76
Abb. 6.9.1 Mehrfachinfektionen	79
Abb. 6.9.2 Doppel- und Dreifachinfektionen der Zecken	79

Tabellenverzeichnis

Abb. 7.1.1 Karte: Definierte Regionen zur Borrelienprävalenz	81
Abb. 7.5.1 gemeldete Erythema migrans Fälle in Thüringen und Jena 2006 und 2007	98
Abb. 7.5.1 <i>Babesia microti</i> Isolate Jena/Deutschland 18S-rRNA-Gen	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1 Untersuchte Zecken im Jahr 2006	23
Tab. 4.2 Untersuchte Zecken im Jahr 2007	23
Tab. 4.3 Borrelien Primersequenzen	27
Tab. 4.4 Borrelien: PCR-Ansatz.....	28
Tab. 4.5 Borrelien: PCR-Bedingungen im Thermozykler	28
Tab. 4.6 Primersequenzen für Babesien-PCR.....	29
Tab. 4.7 Babesien: PCR-Ansatz	30
Tab. 4.8 Babesien: PCR-Bedingungen im Thermozykler	31
Tab. 4.9 Borrelien: Übersicht Schnittstellen der Restriktionsenzyme	33
Tab. 4.10 Borrelien: Spezieszuordnung nach dem RFLP Muster.....	34
Tab. 4.11 Babesien: Schnittstelle des Restriktionsenzymes.....	36
Tab. 4.12 Sequenzierung: PCR-Bedingungen.....	37
Tab. 5.1 Primer	40
Tab. 6.1 Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung	43
Tab. 6.2 Übersicht: Zecken mit Borrelien-Doppelinfektionen.....	54
Tab. 6.3 Borrelien: Ergebnis Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	60
Tab. 6.4 Borrelienprävalenzen 2006.....	61
Tab. 6.5 Borrelien: Ergebnis 2006 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	61
Tab. 6.6 Borrelienprävalenzen 2007	62
Tab. 6.7 Borrelien: Ergebnis 2007 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	62
Tab. 6.8 Übersicht Subtypen <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	68
Tab. 6.9 Babesien: Ergebnis Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	71
Tab. 6.10 Babesien Prävalenzen 2006	71
Tab. 6.11 Babesien: Ergebnis 2006 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	72
Tab. 6.12 Babesien Prävalenzen 2007	72
Tab. 6.13 Babesien: Ergebnis 2007 Kreuztabelle Chi-Quadrat-Test.....	73
Tab. 6.14 Subtypen Babesien.....	77
Tab. 6.15 Koinfektionen Borrelien/Babesien in den einzelnen Monaten.....	78
Tab. 6.16 Mehrfachinfektionen nach Entwicklungsstadium	80
Tab. 8.1 Konfidenzintervalle der Hauptaussagen	113

Anhang

Entwicklungs- stadium	Borrelien positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	100/277	0.361	0.305	0.4209	30,536,142,1
Weibchen	84/293	0.2867	0.2363	0.3428	23,628,734,3
Unphen	86/430	0.2	0.1639	0.2416	16,420,024,2
total	270/1000	0.27	0.2429	0.2989	24,327,029,9

8.1 Infektionsraten für Borrelien

Entwicklungs- stadium	Koinfektionen positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	2/277	0.0072	0.0012	0.0287	0,10,72,9
Weibchen	4/293	0.0137	0.0044	0.037	0,44,43,7
Unphen	8/430	0.0186	0.0087	0.0378	0,94,93,8
total	14/1000	0.014	0.008	0.024	0,84,42,4

8.2 Doppelinfektionen mit zwei Borrelien-Subtypen

Entwicklungs- stadium	Babesien positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	13/277	0.0469	0.0263	0.0808	2,64,78,1
Weibchen	29/293	0.099	0.0684	0.1405	6,89,944,1
Unphen	8/430	0.0186	0.0087	0.0378	0,94,93,8
total	50/1000	0.05	0.0377	0.0659	3,85,06,6

8.3 Infektionsraten für Babesien

Entwicklungs- stadium	Koinfektionen positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	9/277	0.0325	0.0159	0.0629	1,63,36,3
Weibchen	7/293	0.0239	0.0105	0.0507	1,12,45,1
Unphen	0/430	0	0	0.011	0,00,04,1
total	16/1000	0.016	0.0095	0.0264	1,04,62,7

8.4 Koinfektionen mit Borrelien und Babesien

Anhang

Entwicklungs- stadium	Koinfektionen positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	17/277	0.0614	0.0373	0.0983	3,76,19,8
Weibchen	18/293	0.0614	0.0378	0.097	3,86,19,7
Keimen	5/430	0.0116	0.0043	0.0285	0,44,22,9

total	40/1000	0.04	0.0291	0.0546	2,94,05,5
-------	---------	------	--------	--------	-----------

8.6 Mehrfachinfektionen Brucellen/Rickettsien

Entwicklungs- stadium	Koinfektionen positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	6/277	0.02170	0.0089	0.0489	0,92,24,9
Weibchen	5/293	0.0171	0.0063	0.0417	0,64,74,2
Keimen	5/430	0.0116	0.0043	0.0285	0,44,22,9

total	16/1000	0.016	0.0095	0.0264	1,04,62,6
-------	---------	-------	--------	--------	-----------

8.6 Mehrfachinfektionen Brucellen/Anaplasmen

Entwicklungs- stadium	Koinfektionen positiv	Relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	6/277	0.02170	0.0089	0.0489	0,92,24,9
Weibchen	10/293	0.0341	0.0174	0.0638	1,73,46,4
Keimen	3/430	0.007	0.0018	0.022	0,20,72,2

total	19/1000	0.019	0.0118	0.0301	1,24,93,0
-------	---------	-------	--------	--------	-----------

8.7 Mehrfachinfektionen Babesien/Rickettsien

Ab. 81 Konfidenzintervalle der Hauptaussagen

Angegeben wurden die oberen (go) und unteren Grenzen (gu) im Rahmen des 95% Konfidenzintervalls.

Anhang

```
B515 1 GAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAG 60
      |
EF 998 GAGAGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGTCTGAAACTTAAAG 1057

B515 61 GAATTGACGGAGGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG 120
      |
EF 1058 GAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG 1117

B515 121 AAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCT 180
      |
EF 1118 AAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAGAGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTCT 1177

B515 181 ATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATATCCG 239
      |
EF 1178 ATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATATCCG 1235
```

Abb. 71 Babesia microti Isolate aus Deutschland 18S-rRNA

Teilsequenz Länge=1687bp

Die obere Sequenz ist Zeckenprobe 515 nach der Babesien-Amplifikation und die untere Sequenz ist die *Babesia microti* Sequenz, die von dem ersten europäischen autochthonen *Babesia microti* Fall einer Patientin aus Jena (Hildebrandt et al. 2007) in die Datenbank gestellt wurde. Interessanterweise findet sich eine Übereinstimmung von 99%.

(EF- Accession Nummer EF413181, B515-*Babesia microti* Sequenz aus der Zecke Nummer 515)

Danksagung

Nachfolgend möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Ausführung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. E. Straube für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena, sein Interesse am Fortschritt und Gelingen der Arbeit, seiner Hilfsbereitschaft bezüglich der Erstellung und Realisierung von Publikationen und Posterpräsentationen und für seine freundliche und enthusiastische Unterstützung beim Sammeln der Zecken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. A. Hildebrandt, die mich die ganze Zeit bei der Gestaltung und Fertigstellung der Arbeit begleitete und in naturwissenschaftliche Denk- und Arbeitsweisen einführte, mir bei allen Fragen mit hilfreichen Anregungen zur Verfügung stand, für das schnelle Korrekturlesen und den stetig netten Kontakt.

Frau G. Gaschler möchte ich herzlich danken für die nette und freundschaftliche Unterstützung und Einarbeitung in die praktische Laborarbeit mit vielen hilfreichen Anregungen, Tipps und Kiffen, für ihren engagierten Einsatz und ihr Herz für Studenten.

Ein besonderes Dankeschön gebührt meiner Familie, die mir das Medizinstudium ermöglichte, meiner Schwester Sandra für das intensive Korrekturlesen und meinem Freund Achim, der mir stets Verständnis entgegenbrachte, mich in die Geheimnisse der Computerkenntnisse einweihte und mir das nötige Selbstvertrauen vermittelte.

Publikationen

Poster:

Hildebrandt, A., **Pauliks, K.**, Sachse, S., Straube, E. 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and coinfection with *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Poster und Kurzvortrag beim X International Jena Symposium on Tick Borne Diseases"19. -21. März 2009

Hildebrandt, A., **Pauliks, K.**, Sachse, S., Straube, E. 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies and coinfection with *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). Poster zur 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)"20.-23. September 2009.

Hildebrandt, A., **Pauliks, K.**, Kämer, A., Sachse, S., Straube, E. 2010. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Middle Germany. Poster zur 20th ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Tagung"10.- 13. April 2010.

Originalartikel:

Hildebrandt, A., **Pauliks, K.**, Sachse, S., Straube, E. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Journal: Vector-Borne and Zoonotic Diseases, in Druck

Hildebrandt A., **Pauliks, K.**, Kämer, A., Sachse, S., Straube, E. Diversity and coexistence of several pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Artikel in Vorbereitung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. E. Straube, Frau Dr. A. Hildebrandt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

KPauliks