

**Prävalenz von Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila*  
Genogruppe und Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato  
Komplexes in *Ixodes ricinus* Zecken aus dem Ilmtal**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Anke Hildebrandt  
geboren am 05. Juli 1978 in Gotha**

## **Gutachter**

- 1.**
- 2.**
- 3.**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

## **gewidmet meiner Familie**

Familie-  
kostbares Kleinod  
auf dieser Erde, rettender, schützender  
Hafen auch.  
Im Glück  
wirst du in ihr  
geborgen sein, im Unglück  
bist du nicht allein.  
Familie zieht  
den schützenden Kreis.  
Wohl dem,  
der sich in ihr  
geborgen weiß.

Carl Peter Fröhling (\*1933), deutscher Germanist, Philosoph und Aphoristiker

## **Inhaltsverzeichnis**

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Ixodes ricinus</i>	1
1.1.1. Morphologie, Entwicklung	1
1.1.2. Wirtsbefall, Saugakt, Prophylaxe, Zeckenentfernung	3
1.2. Ehrlichien	5
1.2.1. Geschichte, Klassifizierung, Morphologie, Übertragung, Pathogenität, Epidemiologie	5
1.2.2. Klinisches Bild beim Menschen nach Infektion, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe	8
1.3. Borrelien	10
1.3.1. Geschichte, Klassifizierung, Morphologie, Übertragung, Pathogenität, Epidemiologie	10
1.3.2. Klinisches Bild beim Menschen nach Infektion, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe	13
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3. Methoden und Materialien</b>	<b>16</b>
3.1. Allgemeine Methoden	16
3.1.1. Sammeln der Zecken	16
3.1.2. DNA-Extraktion aus der Zecke	17
3.1.3. DNA-Extraktion aus den Borrelien-Vergleichsstämmen	18
3.1.4. Photometrische Konzentrationsmessung der extrahierten DNA	19
3.1.5. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	20
3.1.6. Agarose-Gel-Elektrophorese	21
3.1.7. Sequenzierung	21
3.1.8. Statistik	23

3.2.	Ehrlichienuntersuchungen	24
3.2.1.	PCR	24
3.2.2.	Gel-Elektrophorese	27
3.2.3.	Klonierung der PCR-Fragmente	27
3.3.	Borrelienuntersuchungen	33
3.3.1.	PCR	33
3.3.2.	Gel-Elektrophorese	36
3.3.3.	Restriktionsverdau	36
3.4.	Materialien	41
3.4.1.	DNA-Extraktion aus der Zecke und den Borrelien-Vergleichsstämmen	41
3.4.2.	Photometrische Konzentrationsmessung	41
3.4.3.	PCR	41
3.4.4.	Gel-Elektrophorese	42
3.4.5.	DNA-Extraktion aus dem Gel	42
3.4.6.	Sequenzierung	43
3.4.7.	Klonierung der PCR-Fragmente	43
3.4.8.	Restriktionsverdau	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1.	Photometrische Konzentrationsmessung	45
4.1.1.	DNA-Material aus der Zecke	45
4.1.2.	DNA-Material aus den Borrelien-Vergleichsstämmen	46
4.2.	Ehrlichienuntersuchungen	46
4.2.1.	Ergebnisse der Ehrlichien-PCR, Sequenzierung	46
4.2.2.	Klonierung und wiederholte Sequenzierung der PCR-Fragmente	50
4.3.	Borrelienuntersuchungen	56
4.3.1.	Ergebnisse der Borrelien-PCR	56
4.3.2.	Speziesdifferenzierung der Borrelien-DNA	61
4.4.	Prävalenzen	65
4.4.1.	Ehrlichien: Verteilung, Entwicklungsstadium, saisonale Abhängigkeit, Sequenzanalyse	65
4.4.2.	Borrelien: Verteilung, Entwicklungsstadium, saisonale Abhängigkeit, Speziesdifferenzierung	71
4.4.3.	Koinfektion	73
4.4.4.	Statistik	73

<b>5. Diskussion</b>	<b>75</b>
5.1. Ehrlichien	75
5.1.1. Prävalenz	75
5.1.2. Typisierung	76
5.1.3. Ausblick	77
5.2. Borrelien	78
5.2.1. Prävalenz	78
5.2.2. Speziesdifferenzierung	80
5.2.3. Ausblick	81
5.3. Koinfektion	82
5.3.1. Prävalenz	82
5.3.2. Bewertung	83
5.4. Vielfalt der Nachweisverfahren	84
5.4.1. Ehrlichien	84
5.4.2. Borrelien	85
5.4.3. kritische Schlußbetrachtung der eigenen Methoden	86
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>87</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>91</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>Danksagung</b>	<b>XI</b>
<b>Publikationen zu den Ergebnissen dieser Arbeit</b>	<b>XIII</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>XIV</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>XV</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildungen:</u>	Seite
Abb. 1.1.1.	Entwicklungszyklus der Zecke 2
Abb. 3.1.1.	Thüringen Karte: Lage der Habitate 17
Abb. 3.2.1.	Ehrlichien-PCR 25
Abb. 3.2.3.	pGEM-T <sup>®</sup> -Easy Vector 28
Abb. 3.3.1.	Borrelien-PCR 33
Abb. 3.3.3.	Restriktionsverdau 38
Abb. 4.2.1.a	Spezifität der Primer für die <i>Ehrlichia phagocytophila</i> Gruppe 47
Abb. 4.2.1.b	kleines PCR-Fragment 48
Abb. 4.2.1.c	großes PCR-Fragment 49
Abb. 4.2.2.a	Plamidisolierung des kleinen PCR-Fragmentes 51
Abb. 4.2.2.b	Plasmid-PCR des kleinen PCR-Fragmentes 52
Abb. 4.4.2.c	Plamidisolierung des großen PCR-Fragmentes 53
Abb. 4.2.2.d	Plasmid-PCR des großen PCR-Fragmentes 54
Abb. 4.3.1.a	Alignment des OspA Gens der 4 Vergleichsstämme 56
Abb. 4.3.1.b	Primäramplifizierung 59
Abb. 4.3.1.c	"semi-nested" PCR 60
Abb. 4.3.2.a	Restriktionsverdau <i>Borrelia afzelii</i> 62
Abb. 4.3.2.b	Restriktionsverdau <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto und <i>Borrelia valaisiana</i> 62
Abb. 4.3.2.c	Restriktionsverdau <i>Borrelia garinii</i> SG 4 und <i>Borrelia garinii</i> SG 5 63
Abb. 4.3.2.d	Restriktionsverdau <i>Borrelia garinii</i> SG6 63
Abb. 4.3.2.e	Restriktionsverdau der Koinfektion <i>Borrelia garinii</i> SG6 / <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto 64
Abb. 4.4.a	Koinfektionsrate 66
Abb. 4.4.b	Vergleich der Infektionsraten in den Habitaten 66
Abb. 4.4.c	Prävalenz von Ehrlichien, Borrelien und die Koinfektionsrate in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium 67
Abb. 4.4.d	Saisonale Entwicklung der Infektionsraten 67
Abb. 4.4.e	Phylogenetischer Baum 69

Abb. 4.4.f	Sequenzunterschiede der im Ilmtal detektierten Ehrlichien im amplifizierten Bereich des 16S rRNA Gens	70
Abb. 4.4.g	Prävalenz der einzelnen Spezies des <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato Komplexes	72
Abb. 7.1.	Sequenzergebnisse der nicht klonierten 151 bp PCR-Fragmente	91
Abb. 7.2.	Zusammensetzung der klonierten PCR-Fragmente	92
Abb. 7.3.	Vorschlag für die Arbeit mit Restriktionsenzymen im amplifizierten DNA-Abschnitt	97
<u>Tabellen:</u>		
Tab. 3.1.1.	Gesammelte Zecken in den 3 Habitaten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium	16
Tab. 3.2.1.	Konzentrationen und Sequenzen der Ehrlichien-PCR Primer	26
Tab. 3.2.3.a	Sequenzen der Plasmidprimer	30
Tab. 3.2.3.b	Sequenzen der Primer zur Vervollständigung der Sequenzierung des großen PCR-Fragmentes	32
Tab. 3.3.1.	Konzentrationen und Sequenzen der Borrelien-PCR Primer	34
Tab. 3.3.3.a	Borrelien-Speziesdifferenzierung durch Restriktionsverdau nach der Vorlage von München	37
Tab. 3.3.3.b	Ergänzung des Restriktionsverdaus	37
Tab. 3.3.3.c	Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme	37
Tab. 4.1.1.	DNA-Konzentrationsmessung der extrahierten Zecken-DNA	45
Tab. 4.1.2.	DNA-Konzentrationsmessung der extrahierten DNA aus den Borrelien-Vergleichsstämmen	46
Tab. 4.4.a	Infektionsraten in Abhängigkeit vom Monat des Fangens	68
Tab. 4.4.b	Anteilmäßige Verteilung der Vertreter des <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato Komplexes in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium	72
Tab. 4.4.c	Konfidenzintervalle für die Infektionsraten mit Ehrlichien und / oder Borrelien	74
Tab. 5.1.1.	Ehrlichien-Infektionsraten anderer Untersuchungen	75
Tab. 5.2.1.	Borrelien-Infektionsraten anderer Untersuchungen	78
Tab. 5.3.1.	Koinfektionsraten anderer Untersuchungen	82

Tab. 7.1.	Kreuztabellen der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien bezüglich des Geschlechtes	98
Tab. 7.2.	Kreuztabellen der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien bezüglich der Habitate Bad Berka, Belvedere und Dienstedt	99
Tab. 7.3.	Kreuztabellen der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien bezüglich der saisonalen Entwicklung	100

## Abkürzungen:

[ ]	Quellenangabe
A, a	Arginin
Abb.	Abbildung
Accession No	Accession-Nummer in der NCBI-Datenbank
afz	<i>Borrelia afzelii</i>
ank Gen	Gen mit Ankyrin "repeats", das für das AnkA Protein kodiert
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-amino-transferase
Aqua dest.	destilliertes Wasser (Aqua destillata)
ARDS	akute respiratorische Insuffizienz (adult respiratory distress syndrome)
ASAT	Aspartat-aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Borrelia</i>
B. b.	<i>Borrelia burgdorferi</i>
bp	Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
buffy coat	Leukozytenfraktion des Blutes
bzw.	beziehungsweise
C, c	Cytosin
CD	internationales System für Bezeichnung von Differenzierungsantigenen (cluster of differentiation bzw. cluster determinants)
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein (C-reactive protein)
d	desoxy
Da	Dalton
dd	didesoxy
DH82-Zellen	Hunde-Makrophagen-Zelllinie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleinsäure-triphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA (double strang DNA)
<i>E. equi</i>	<i>Ehrlichia equi</i>
<i>E. phagocytophila</i>	<i>Ehrlichia phagocytophila</i>
<i>E. platys</i>	<i>Ehrlichia platys</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
et al.	und andere
fw.	vorwärts (forward)
FSME	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis
G, g	Guanin
g	Gramm
gar	<i>Borrelia garinii</i>
GB	Großbritannien
GE	Granulozytäre Ehrlichien
<i>gltA</i>	Zitrat-Synthase Gen
GroEL	58- bis 65-kDa großes Protein mit Verwandtschaft zur HSP60-Familie
GroES	10- bis 20-kDa großes Protein mit Verwandtschaft zur HSP60-Familie
h	Stunde
HGE	humane granulozytäre Ehrlichiose (human granulocytic ehrlichiosis)
HGE-agent, HGE agens	Erreger der <i>Ehrlichia phagocytophila</i> Genogruppe, welcher die humane granulozytäre Ehrlichiose hervorruft
HL60-Zellen	humane Promyelozyten-Zelllinie
HME	humane monozytäre Ehrlichiose
IDE8 Zellen	embryonale Zeckenzellen
IFT (IFA)	Immunfluoreszenztest (Immunfluoreszenzassay)
Ig	Immunglobulin
IHA	indirekter Hämagglutinationstest
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktosid, C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S
ISE6 Zellen	embryonale Zeckenzellen

K	Kontrolle
k	Kilo
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LDH	Laktatdehydrogenase
LGE	Ilama granulozytäre Ehrlichiose, Wirtstiere sind Lamas
LPS	Lipopolysaccharid
LOS	Lipooligosaccharid
M	Molar (Mol pro Liter) oder Marker
m	Meter oder Milli ( $10^{-3}$ )
MAbs	monoklonale Antikörper (monoclonal antibodies)
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
min	Minute
ml	Milliliter
MW	Molekulargewicht
N	N kann für jede der Basen Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin stehen
n	Nano ( $10^{-9}$ )
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
Osp	Oberflächenprotein (outer surface protein)
p	Piko ( $10^{-12}$ ) oder Proben
p44 Gen	Gen, das ein 44 kDa großes Oberflächenprotein kodiert
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese (pulsed field gel electrophoresis)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration (pondus hydrogenii)
PKo, PKa, PBi	Bezeichnungen für die Vergleichsstämme der Borrelien aus München
RFLP	Längenpolymorphismus von Restriktionsfragmenten (restriction fragment length polymorphism)
rki	Robert-Koch-Institut (" <a href="http://www.rki.de">http://www.rki.de</a> ")
RNA	Ribonukleinsäure

RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rv.	rückwärts (reverse)
sek.	Sekunde
SG1-6	Münchener Borrelienspeziesklassifikation
s.l.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
ss	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
ssDNA	Einzelstrang-DNA (single strand DNA)
SYBR-Green I	Farbstoff, der Nukleinsäuren bindet; im Gegensatz dazu eignet sich SYBR-Green II für das Arbeiten mit RNA
T, t	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat / EDTA-Puffer
Taq	DNA abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	Toxic Shock-Syndrome
U, u	Uracil
U	Einheit enzymatischer Aktivität (Units)
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
val	<i>Borrelia valaisiana</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indoxyl- $\beta$ -D-galaktosid, C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> BrClNO <sub>6</sub> XF
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

# 1. Einleitung

## 1.1. *Ixodes ricinus*

### 1.1.1. Morphologie, Entwicklung

*Morphologie:* [195, 196]

Zecken gehören zum Stamm der Gliederfüßler (Arthropoda) und bilden innerhalb der Klasse der Spinnentiere (Arachnida) und der Unterklasse der Milben / Zecken (Acari) eine Überfamilie (Ixodoidea). Schildzecken besitzen einen ungegliederten Leib mit hervorstehenden Mundwerkzeugen (Gnathosoma), Pedipalpen und dem Schild (Scutum). Das Rostrum setzt sich zusammen aus Cheliceren, Chelicerenscheiden und Hypostom. Die Larven haben sechs und alle anderen Entwicklungsstadien acht Beine.

Eine Besonderheit in Bezug auf die Rolle als Vektor für verschiedene Erreger ist die intrazelluläre Verdauung. Dies ist für die Gruppe der Arthropoden eher ungewöhnlich. Im chemischen Milieu des Mitteldarmes befinden sich keine aggressiven Verdauungsenzyme, so daß sich z.B. *Borrelia burgdorferi* bevorzugt im Mikrovillisaum des Darmepithels aufhalten und reproduzieren kann. Die Generationszeit der Borrelien beträgt zwischen 6 h und 20 h, wobei verschiedene Faktoren, wie z.B. die Aktivierung des Komplementsystems der Zecke, für das Überleben im Wirt entscheidend sind. Die meisten Zeckenarten sind langlebig und widerstandsfähig gegenüber klimatischen Bedingungen, was die Gefahr der weiterbestehenden Übertragungsmöglichkeit für Monate bis zu einigen Jahren birgt. Insgesamt existieren mehr als 300 Arten, von denen in Deutschland der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) mit 95%-igem Anteil an der Gesamtpopulation am häufigsten vertreten ist.

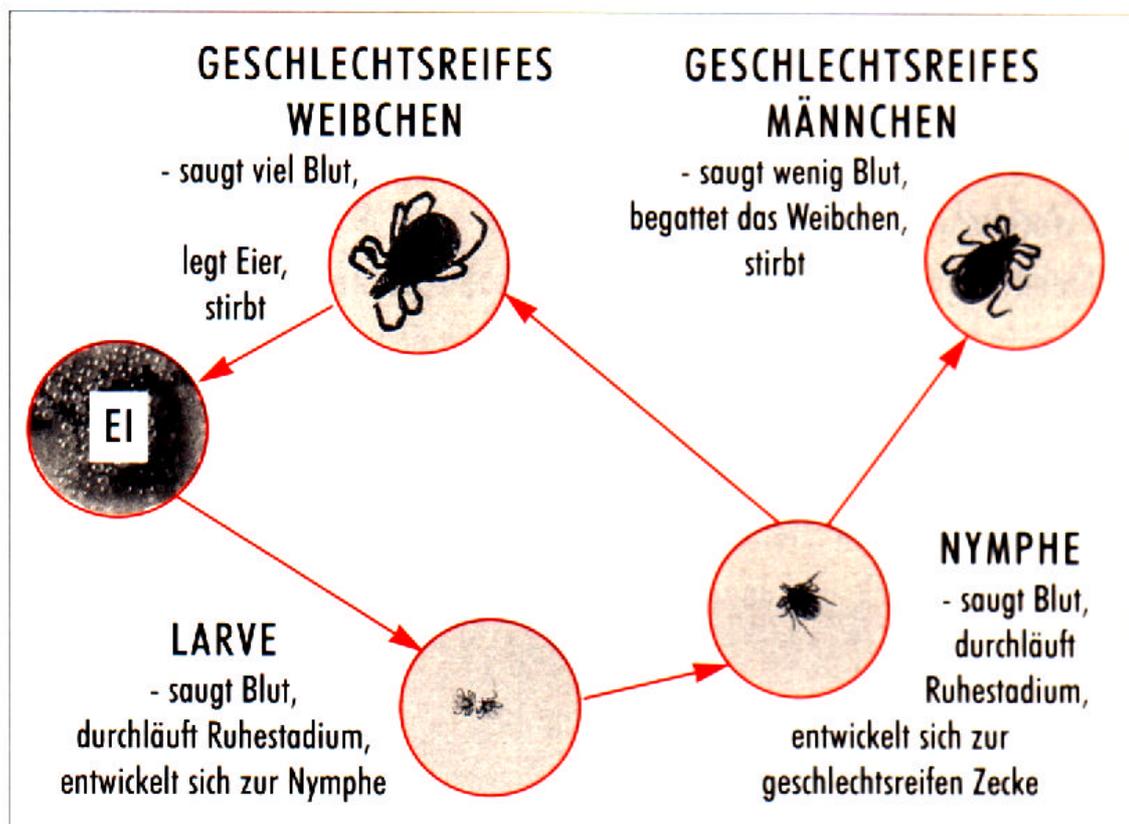
*Entwicklung:* [23, 195, 196]

Man findet 3 Entwicklungsstadien: Larve, Nymphe und adulte Zecken. In jedem dieser Stadien ist eine Blutmahlzeit notwendig, um sich weiterzuentwickeln. Als Wirte fungieren Säugetiere, Vögel und Reptilien.

Aus abgelegten Eiern im Laubstreu schlüpfen die sechsbeinigen Larven in einer Größe von bis zu 0,6 mm. Nach einer Blutmahlzeit und anschließendem Ruhestadium von einigen Tagen bis Monaten häuten sie sich zu Nymphen, welche schon bis 1 mm Größe erreichen. Die Nymphen saugen 3 bis 4 Tage und durchlaufen danach einen mehrwöchigen Reifungsprozeß zur geschlechtsreifen, adulten Zecke. Die Männchen, etwa 2,5 mm groß, saugen kaum Blut. Ihr Rücken ist ganz vom dunkelbraunen Schild bedeckt. Im Gegensatz dazu sind die

Weibchen wesentlich größer (2,4 bis 4,8 mm) und besitzen ein augenloses Rückenschild, das ebenfalls dunkel- bis schwarz-braun ist, aber nur den oberseitigen, vorderen Teil des weichhäutigen Körpers bedeckt. Beim Saugakt nehmen sie das 100 bis 200-fache ihres Gewichtes an Blut auf, wobei ihr Leib erheblich anschwillt. Während dieses Prozesses findet auch die Befruchtung statt. Die Männchen sterben kurz nach der Kopulation, die Weibchen nach der Ablage von bis zu 2000 Eiern in die oberen Erdschichten. Je nach Wirtsorganismus können beim Saugen auch entsprechende Erreger aufgenommen werden. Eine infizierte Zecke gibt die aufgenommenen Pathogene bei der nächsten Blutmahlzeit an ihren Wirt weiter, d.h. an andere Säugetiere, Vögel oder auch den Menschen. Unter optimalen klimatischen Bedingungen wird der geschilderte Entwicklungszyklus in einem Jahr durchlaufen, meist dauert es jedoch zwei oder drei Jahre. Die *Abb. 1.1.1.* stellt die Entwicklung der *Ixodes ricinus* Zecken schematisch dar.

Die Hauptaktivität der Zecken findet man in den Monaten März bis Oktober. Dabei ist an besonders heißen Tagen die Aktivität am frühen Vormittag, Abend und nachts am größten. Bei Temperaturen über 10°C läßt sich gelegentlich auch eine ganzjährige Aktivität beobachten.



*Abb. 1.1.1.*: Entwicklungszyklus der Zecke [23]

### 1.1.2. Wirtsbefall, Saugakt, Prophylaxe, Zeckenentfernung

*Wirtsbefall:* [164]

Larven und Nymphen bevorzugen Säugetiere kleiner und mittlerer Größe sowie Vögel, adulte Tiere parasitieren überwiegend mittelgroße bis große Säugetiere. Waldränder mit angrenzenden Wiesen, Waldlichtungen, Unterholz, Bach- und Flußauen und Übergänge von Laub- zu Nadelwald sind typische Habitate. Larven sitzen auf Gräsern in ca 30 cm Höhe über dem Erdboden, Nymphen in ca 100 cm Höhe und Adulte sind in Höhen bis zu 150 cm zu finden, nicht aber auf Bäumen. Anhand bestimmter Signale, wie z.B. Buttersäure im Schweiß, erkennen sie ihren Wirt. Ein nur wenige Sekunden dauernder Kontakt ist für das Festhalten am Wirt ausreichend. Bevorzugte Orte zum Blut saugen sind feuchte, warme und gut durchblutete Körperstellen. Beim Menschen sind solche Bereiche v.a. dünne Hautpartien, die behaarte Kopfhaut, Ohren, Hals, Arm- und Kniebeugen, Leistenregion, sowie Hände und Füße.

*Saugakt:* [195]

Die Parasiten besitzen stechend saugende Mundwerkzeuge und können sich mit ihrem bezahnten Saugorgan (Hypostom) in der Haut verankern. Die Zecken zementieren sich im Laufe des Saugaktes mit ihrem Hypostom in den Stichkanal ein. Deshalb lassen sie sich schwerer entfernen, wenn sie lange gesaugt haben. Der Zeckenstich wird oft nicht bemerkt, da er durch die betäubende Wirkung des Speichels schmerzlos ist. Als Poolsauger schaffen sich die Zecken eine Wundhöhle, die Blut, verdaute Gefäßwände, aufgelöste Zellen und Gewebssaft enthält. Während des Saugens wird Speichel produziert, so daß eine Aufnahme von Krankheitserregern von dem entsprechenden Wirt und auch die Übertragung an den folgenden Wirtsorganismus, auch den Menschen, möglich ist.

Zu den übertragenen Erregern gehören u.a.: [195]

- Coxiellen (z.B. *Coxiella burnetii*: Erreger des Q-Fieber)
- Francisellen (z.B. *Francisella tularensis*: Erreger der Tularämie)
- Rickettsien: Erreger des Rocky Mountains spotted fever (RMSF), Zeckenbißfieber
- Brucellen: Erreger der Brucellose
- Salmonellen: Erreger des Typhus und Parathyphus
- Borrelien: Erreger der Borreliose und des Rückfallfiebers
- Leptospiren: Erreger des Morbus Weil
- Ehrlichien: Erreger der Ehrlichiose

- Viren: Frühsommermeningoenzephalitis (FSME), Russian-spring-summer-encephalitis (RSSE), Influenza

Die Dauer der Blutmahlzeit ist vom Entwicklungsstadium abhängig. So saugen Larven 2-4 Tage, Nymphen 3-5 Tage und die adulten Weibchen 6-10 Tage. Dabei nehmen 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 ihrer Körpermasse zu. In der ersten Phase des Saugens kommt es zu intensiven Wachstumsvorgängen an Kuticula und Mitteldarmepithel, welche zusätzlich in den letzten 12-24 Stunden gedehnt werden. Die im Vergleich zur Zeckenhämolymphe hyposmotische Mahlzeit wird mehr oder weniger stark eingedickt und dem Wirt ein Teil des aufgenommenen Wassers über die Speicheldrüsen reinjiziert. Ziel der Blutkonzentrierung ist neben osmoregulatorisch günstigeren Bedingungen auch die Maximierung der Substanzaufnahme. Während der gesamten Zeit der Nahrungsaufnahme kommt es ständig zur Abgabe von Speichelsekreten, u.a. schnell erhärtende Zementsubstanzen zur Verankerung in der Stichwunde, immunsuppressive, antihämostatische, antiphlogistische oder analgetisch wirkende Verbindungen. Besondere Bedeutung für die Osmoregulation hat die hyposmotische Sekretion, die mit Zunahme der Saugdynamik einsetzt.

#### *Prophylaxe:* [164]

Die beste Prophylaxe ist das Meiden der Zeckenbiotope bzw. bei Aufenthalt in einem solchen das Tragen von möglichst geschlossener, heller Kleidung. Ein sorgfältiges Absuchen des ganzen Körpers ist notwendig, um auch versteckte Zecken in Hautfalten zu entdecken. Repellents, wie z.B. Autan, haben nur eine etwa für zwei Stunden begrenzte Wirkung.

#### *Zeckenentfernung:* [164]

Bezüglich der fachgerechten Entfernung einer festgesaugten Zecke existieren verschiedene Theorien. Das Robert-Koch-Institut empfiehlt eine Entfernung mit einer Pinzette oder den Fingernägeln, möglichst ohne den Zeckenleib zu knicken oder zu quetschen. Damit soll verhindert werden, daß infizierter Speichel in die Injektionsstelle gelangt. Von der Anwendung von aggressiven Mitteln, u.a. Alkohol, Nagellack oder Ölen wird abgeraten. Hände und Einstichstelle sind nach der Zeckenentfernung zu desinfizieren. Tritt dennoch nach wenigen Tagen im entsprechenden Bereich eine Entzündung auf, ist ein Arzt aufzusuchen ("<http://www.rki.de>").

## **1.2. Ehrlichien**

### **1.2.1. Geschichte, Klassifizierung, Morphologie, Übertragung, Pathogenität, Epidemiologie**

*Geschichte:* [5, 15, 35, 47, 60, 71, 129, 148, 163]

- 1935 Donatien und Lestoquard entdecken Rickettsien-ähnliche Organismen in algerischen Versuchshunden mit schwerer fieberhafter Erkrankung, Panzytopenie und nachweisbarem Zeckenbiß. Sie nennen den Erreger *Rickettsia canis*, der besonders Monozyten befällt.
- 1940 Gordon et al. beschreiben den bereits 1932 beobachteten Erreger des Zeckenbißfiebers *Rickettsia phagocytophila*. Er führt bei Wiederkäuern zu fieberhafter Erkrankung mit Leukopenie, Aborten und verminderter Milchproduktion. Zielzellen sind Granulozyten.
- 1945 Zu Ehren von Paul Ehrlich (1854-1915) werden beide Erreger durch Moshkovski umbenannt in *Ehrlichia canis* und *Ehrlichia phagocytophila*. Wenig später kommt *Ehrlichia risticii*, Erreger des „potomac horse fever“, hinzu.
- 1953 *Ehrlichia sennetsu* wird als erster humanpathogener Vertreter der Ehrlichien bekannt.
- 1969 *Ehrlichia equi* wird erstmals beschrieben.
- 1986 Der erste Fall einer durch Zecken übertragenen Ehrlichiose beim Menschen wird in den USA bekannt. Man vermutet als Erreger am wahrscheinlichsten *Ehrlichia canis*. Zwischen 1985 und 1990 wurden weitere 200 Fälle von humaner Ehrlichiose registriert.
- 1990 Die erfolgreiche Isolierung und molekulare Typisierung einer nahe verwandten Spezies aus dem Blut eines Soldaten der Kaserne Chaffee im US-Bundesstaat Arkansas führt zu *Ehrlichia chaffeensis*, dem Erreger der humanen monozytären Ehrlichiose (HME).
- 1991 Der erste Fall einer humanen monozytären Ehrlichiose in Europa wird bei einem 21-jährigen Mann aus Portugal beschrieben.
- 1994 Für die humane granulozytäre Ehrlichiose (HGE) kann erstmals 1994 ein Erreger in den Staaten der Ostküste Amerikas gefunden werden. Der erste Vertreter dieser Gruppe, *Ehrlichia sennetsu*, wurde bereits 1953 als *Rickettsia sennetsu* in Japan beschrieben. Typisch ist eine mononukleoseähnliche Erkrankung. Anfangs fand man den Erreger nur in Südostasien, heute ist sein Vorkommen auch in Europa

nachweislich gesichert.

Die Sequenzierung PCR-amplifizierter Bereiche aus dem 16S rRNA Gen und die sich daraus ergebende Klassifizierung erfolgte im mittleren Westen der USA (Minnesota, Wisconsin).

1995 Auch an der Ostküste der USA lies sich die HGE nachweisen (Connecticut, New York).

1996 Es hatte nur zwei Jahre gedauert bis nach der Entdeckung der HGE der erste Fall in Europa entdeckt wurde. Betroffen war eine 70-jährige Patientin aus Slovenien.

1997 LGE wird erstmals beschrieben.

*Klassifizierung:* [9, 31, 112, 141, 163, 215]

Innerhalb der Subdivision der Purpurbakterien sind die Ehrlichien mit den Enterobakterien verwandt. Anhand der Sequenz des 16S rRNA Gens läßt sich eine enge Beziehung zu Rickettsien aufzeigen und eine Einteilung in 3 Genogruppen vornehmen:

- *Ehrlichia-canis*-Gruppe: *Ehrlichia canis*
  - I *Ehrlichia chaffeensis* (humanpathogen)
  - Ehrlichia muris*
  - Ehrlichia ewingii* (humanpathogen)
- *Ehrlichia-phagocytophila*-Gruppe:
  - II *Ehrlichia phagocytophila*
  - Ehrlichia equi*
  - HGE-agent (humanpathogen)
  - Ehrlichia microti*
  - LGE-agent
  - Ehrlichia platys*
- *Ehrlichia-sennetsu*-Gruppe: *Ehrlichia sennetsu* (humanpathogen)
  - III *Ehrlichia risticii*

*E. phagocytophila*, *E. equi* und HGE-agent weisen so große Ähnlichkeiten auf, daß sie demnächst wahrscheinlich als Varianten einer einzigen Spezies betrachtet werden können.

*Morphologie:* [19, 163, 216]

Bei den Ehrlichien handelt es sich um obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien. Sie sind unbeweglich und haben eine kokkoide oder pleomorphe Form. Die Zellwand ist dreischichtig mit einer sehr dünnen äußeren Membran. Sie enthält kein oder nur sehr wenig Lipopolysaccharid (LPS), Lipooligosaccharid (LOS) und Peptidoglycan (Murein). Unter dem Elektronenmikroskop sind kleine (0,2-0,5 µm) und große (0,3-2,3 µm) retikuläre Elementarkörperchen differenzierbar. Eine eigene Synthese des Energieträgers ATP ist den Ehrlichien möglich.

*Übertragung:* [19, 163, 215]

Die Übertragung humanpathogener Ehrlichien erfolgt zum großen Teil durch Zecken. Während in den Vereinigten Staaten *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus* Hauptvektoren für Ehrlichien und andere pathogene Erreger sind, ist es in Europa überwiegend *Ixodes ricinus*. Eine Saugdauer von mindestens 24 Stunden ist günstig für die Wahrscheinlichkeit einer Infektion, wobei aber auch bereits eine kürzere Kontaktzeit mit dem Wirt für die Übertragung ausreichend sein kann, da sich die Ehrlichien in der Speicheldrüse und nicht wie die Borrelien im Mitteldarm aufhalten. Es wird nur ein transstadieller, nicht aber ein transovarieller Weg beobachtet. Aus diesem Grund sind Larven nicht infektiös, sondern nur die Nymphen und adulten Zecken. Sehr selten wird das HGE-agent durch infiziertes Blut oder perinatal (transplazentar oder intrapartal) übertragen.

*Pathogenität:* [19, 88, 141]

Die Erreger der Gruppen I und III befallen überwiegend Monozyten und Makrophagen. Dagegen erfolgt bei Vertretern der Gruppe II die Aufnahme v.a. in neutrophile Granulozyten. Für das Einschleusen in die Wirtszellen wird ein zellständiger Ligand für Selektine (CD 15s) benötigt. Die Erreger vermehren sich in einem besonderen endosomalen Kompartiment durch Zweiteilung. Dadurch sind sie von den Rickettsien abzugrenzen, welche frei im Zytoplasma der Wirtszelle vorkommen. Eine Fusion des Endosoms bzw. Phagosoms mit Lysosomen findet nicht statt. Etwa 7 bis 12 Tage nach der Infektion treten charakteristische 2-5 µm große Einschlüsse auf, die man auch als Maulbeerformen oder Morula bezeichnet und in denen sich etwa 100 Bakterien befinden. Durch Lyse der Wirtszelle oder Exozytose werden die neugebildeten Keime frei und können weitere Zellen befallen.

*Epidemiologie:* [25, 109, 148]

Mit Vertretern der *E. phagocytophila* Gruppe infizierte Zecken findet man inzwischen nicht mehr nur in den USA, sondern auch in europäischen Ländern wie Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Italien, Schweden, Schweiz und Slovenien. Einige Untersuchungen in Gebieten Süddeutschlands ergaben eine Infektionsrate adulter Zecken von 1,6 bis 4 Prozent. Folgedessen ist die Durchseuchung mit Ehrlichien wahrscheinlich etwa zehnfach geringer als mit *Borrelia burgdorferi*, aber trotzdem um ein Vielfaches höher als mit dem FSME-Virus (0,2 Prozent).

### 1.2.2. Klinisches Bild beim Menschen nach Infektion, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe

*Klinisches Bild:* [11, 19]

- **Beschwerden:**

Die klinischen Erscheinungsbilder der HME und HGE sind in ihren Grundzügen sehr ähnlich. Bei ca. 75 Prozent verläuft die Infektion mit dem HGE-agent asymptomatisch, wodurch die Diagnosestellung erschwert ist. Symptome treten v.a. bei älteren Menschen oder Patienten mit immunsupprimierenden Grunderkrankungen und / oder mit Immundefekten auf. Die Inkubationszeit beträgt wenige Tage bis 4 Wochen. Die Krankheit äußert sich zunächst mit unspezifischen, grippeartigen Prodromalerscheinungen, wobei 80 Prozent der Betroffenen über Fieber, Abgeschlagenheit, Schüttelfrost, Schweißausbrüche, Gelenk-, Muskel- und Kopfschmerzen klagen. Oftmals kommen Beschwerden des Gastrointestinaltraktes wie Appetitlosigkeit, Übelkeit, Erbrechen oder Durchfall hinzu. Bei einem Drittel der Patienten wird die Lunge in Form interstitieller Pneumonien mit unproduktivem Husten einbezogen. Selten findet man Exantheme, v.a. bei Kindern mit HME.

- **Häufige Laborbefunde:**

Charakteristische laborchemische Merkmale für eine Ehrlichiose sind Leukopenie (während der Rekonvaleszenzphase oft Lymphozytose), 3 bis 17 Prozent atypische Lymphozyten im Differentialblutbild, Thrombozytopenie, Erhöhung des CRP, der BSG, sowie der Serum-Aminotransferasen ALAT und ASAT, der alkalischen Phosphatase und / oder der LDH.

Eventuell lassen sich auch Anämie, Kreatinin- und Harnstoffanstieg, Hyponatriämie, Bilirubinanstieg oder eine (isolierte) Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit feststellen. Eine ZNS-Beteiligung äußert sich in einer Liquor-Pleozytose, einem Liquor-Proteinanstieg und eventuell grenzwertig erniedrigter Glukosekonzentration.

Die Symptome sind zu einem großen Teil auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine nach Infektion der Monozyten oder Granulozyten zurückzuführen.

▪ Organmanifestation:

Besonders prägnant ist der Befall der Organe des retikuloendothelialen Systems: Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Leber mit diffuser retikuloendothelialer Hyperplasie, fokalen Milz-, Lymphknoten- oder Leberzellnekrosen und Hämophagozytose. Granulome entstehen im Knochenmark und / oder Leber. In anderen Organen dominieren dagegen meist perivaskuläre lympho-histiozytäre Infiltrate. Die auftretenden Komplikationen, wie z.B. akutes Nierenversagen, ARDS mit Lungenversagen oder TSS-ähnliche Symptomatik mit Multiorganversagen können letal enden.

Im Vergleich zu Erkrankungen mit Granulombildungstendenz verlaufen Erscheinungsformen mit nicht granulomatösen Infiltraten erfahrungsgemäß schwerer.

*Diagnostik:* [19, 216]

Empfohlen wird die Kombination mehrerer Verfahren zur Sicherung der Diagnose. Besteht der dringende Verdacht einer Ehrlichieninfektion, versucht man zunächst intrazytoplasmatische Einschlußkörperchen (Morula) in Monozyten oder Granulozyten nachzuweisen. Dafür eignet sich die Giemsa-Färbung eines peripheren Blut- bzw. Knochenmarkausstriches oder der Leukozytenfraktion des Blutes („buffy coat“). Parallel dazu ist eine Ehrlichien-spezifische PCR aus EDTA-Blut sinnvoll. Die Anzucht von *Ehrlichia chaffeensis* in DH82-Zellen oder des HGE-agent in HL60-Zellen bzw. in ISE6-Zellen ist sehr zeitaufwendig und bisher nur in wenigen Speziallaboren durchführbar.

Eine nachträgliche Infektionsbestätigung ist durch einen serologischen AK-Nachweis und AK-Titeranstieg mittels IFT, ELISA oder Western-Blot möglich.

*Therapie:* [163, 216]

Als beste Behandlungsstrategie hat sich die Gabe von Doxzyklin oder Tetrazyklin über 10 bis 14 Tage bewährt. Nur bei bestehender Kontraindikation für Tetrazyklin sollte auf Rifampizin zurückgegriffen werden.  $\beta$ -Laktamantibiotika sind bei einer Ehrlichieninfektion unwirksam.

*Prophylaxe*: [164]

Der Schutz vor Zecken und die sorgfältige Beobachtung eines Patienten nach einem Zeckenbiß bieten zur Zeit die einzige Möglichkeit einer Erkrankung vorzubeugen bzw. rechtzeitig zu erkennen und zu behandeln, da eine wirksame Impfung in den nächsten Jahren nicht erwartet wird.

### **1.3. Borrelien**

#### 1.3.1. Geschichte, Klassifizierung, Morphologie, Übertragung, Pathogenität, Epidemiologie

*Geschichte*: [1, 13, 20, 28, 36, 63, 79, 80, 173, 185]

- 1909 Das Erythema migrans, auf einen Zeckenstich folgend, wird zuerst von Arvid Afzelius aus Schweden beschrieben.
- 1922 Garin und Bujadoux stellen einen Bericht über erste neurologische Manifestationen einer Infektion zusammen, der sich auf schwere radikuläre Schmerzen nach einem Zeckenstich gründet.
- 1930 Sven Hellerström stellt die Verbindung zwischen Erythema migrans und neurologischen Symptomen her.
- 1941 Der Münchner Bannwarth liefert umfangreiche Fallbeschreibungen der lymphozytären Meningoradikulitis, ohne die Beziehung zu einem Zeckenstich zu erkennen.
- 1943 Bo Bäfverstedt stößt auf eine Gruppe gutartiger solitärer und multipler Pseudolymphome in Assoziation zum Erythema migrans.
- 1975 Im US-amerikanischen Ort Lyme, einer kleinen Stadt im Staat Connecticut, kam es zum vermehrten Auftreten von Arthritis bei Kindern und Erwachsenen, bei denen sich ein vorausgegangener Zeckenstich nachweisen ließ.
- 1977 Von Alan Steere et al. wurde über verschiedene Fälle von Arthritis und Erythema migrans nach einem Zeckenstich in Lyme berichtet, worauf 1979 erstmals die Bezeichnung „Lyme Disease“ geprägt wird.
- 1982 Der Erreger *Borrelia burgdorferi* wird erstmals 1982 von Willy Burgdorfer in den USA beschrieben.
- 1984 Zwei Fälle von Lyme-Borreliose beim Menschen mit neurologischer Beteiligung

werden 1984 in Berlin bekannt. Als Überträger wird der gemeine Holzbock betrachtet.

1985 Man sammelte daraufhin 156 Zecken in Forstgebieten von Berlin und konnte in der Folgezeit drei verschiedene Spirochäten-Spezies unter dem Oberbegriff *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolieren: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii*.

*Klassifizierung:* [65, 83, 107, 169, 206, 211]

Zu dem *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplex rechnet man mittlerweile 10 Spezies:

- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto
- *Borrelia garinii*
- *Borrelia afzelii*
- *Borrelia valaisiana*
- *Borrelia lusitaniae*
- *Borrelia japonica*
- *Borrelia andersonii*
- *Borrelia tanukii*
- *Borrelia turdi*
- *Borrelia bissettii*

Für *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* und *Borrelia bissettii* konnte die Humanpathogenität gesichert werden.

*Borrelia valaisiana* wurde bisher noch nicht aus menschlichem Gewebe isoliert. Da aber bereits der Nachweis von DNA in Zecken und Patienten mit Hilfe der PCR gelungen ist, wird auch für diese Spezies Humanpathogenität vermutet.

*Morphologie:* [211]

Die Borrelien sind spiralförmige, bewegliche Bakterien aus der Gruppe der Spirochäten mit 3-30 Windungen. Die Länge des Erregers beträgt etwa 4-30 µm, die Dicke 0,18-0,25 µm. Die Anzüchtung ist schwierig und gelingt nur auf Spezialnährmedien bei einer Kulturdauer von mehreren Wochen. Die Zellen sind von einer unstrukturierten, mukoiden Hülle (S-layer) und darunter liegender trilaminarer Membran umgeben. In relativ großen Ausstülpungen der äußeren und der Protoplasma-Membranen (Gemma), aber auch in kleineren (Blebs), wurde Plasmid-DNA nachgewiesen. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzen Borrelien ein

lineares Chromosom und lineare Plasmide. Für immundominante „outer surface“-Proteine (OspA, OspB und OspC) ist die Erbinformation auf einem linearen und einem zirkularen Plasmid kodiert. Diese Proteine sind immunologisch und genetisch variabel, wobei noch unbekannt ist, unter welchen Bedingungen die chronisch pathologischen Organveränderungen auftreten.

*Übertragung:* [164, 211]

Die Übertragung erfolgt überwiegend durch Zecken, wobei man davon ausgeht, daß die Übertragungswahrscheinlichkeit mit zunehmender Dauer des Saugaktes ansteigt. Bei einer Zeit von weniger als 24 Stunden scheint eine geringe Infektionsgefahr zu bestehen, da die Erreger erst aus dem Mitteldarm in die Speicheldrüse gelangen müssen. Im Gegensatz zu Ehrlichien ist auch eine transovariable Übertragung der Borrelien nachweisbar.

*Pathogenität:* [211]

*Borrelia burgdorferi* ist ein Induktor der Produktion verschiedener Zytokine der Wirtszelle. Die Osp-Proteine werden von der Bakterienzelle benötigt, um an Zellen zu adhären und Zellverbände zu durchdringen. OspA und OspB gelten als wichtige Adhärenzmoleküle. Variationen der Expression der Adhäsine oder möglicherweise auch Antigenvariabilität sind für den Schutz vor der wirtseigenen Immunantwort verantwortlich. Während OspA gewöhnlich auf der Oberfläche vorhanden ist, wird OspC wahrscheinlich zum Zeitpunkt der Blutmahlzeit exprimiert und ist somit ein entscheidender Faktor für Verbreitung und Infektiosität. Durch Eingriffe in die Regulationsmechanismen der T-Zellantwort werden entzündliche Prozesse über lange Zeiträume aufrechterhalten. Für neuropathologische Erscheinungen zieht man molekulare Mimikry in Erwägung, da eine Kreuzreaktivität zwischen Borrelienflagellin und neuronalem Gewebe nachweisbar ist.

*Epidemiologie:* [164, 169]

Während in den USA die Zeckenspezies *Ixodes dammini* als häufigster Überträger von *Borrelia burgdorferi* fungiert, ist es in Mitteleuropa *Ixodes ricinus*. In Europa betragen die Infektionsraten zwischen 2 und 34 Prozent. Befallsgebiete und -flächen Borrelien-infizierter Zecken können nicht eindeutig abgegrenzt werden. In den einzelnen Entwicklungsstadien ist die Durchseuchung unterschiedlich. So sind im Durchschnitt 1 Prozent der Larven, 10 Prozent der Nymphen und 20 Prozent der adulten Zecken infiziert. Wirtstiere sind v.a. Nager, aber auch Wildtiere, Vögel oder Haustiere können eine Rolle spielen. Der Nachweis in Fliegen und

Mücken als Vektoren ist in den USA gelungen. Übertragungen von Mensch zu Mensch wurden bisher nicht festgestellt, allerdings ist auch ein intrauteriner Transfer möglich.

### 1.3.2. Klinisches Bild beim Menschen nach Infektion, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe

*Klinisches Bild:* [195, 206, 211]

*Borrelia burgdorferi* kann aufgrund verschiedener Pathogenitätsmechanismen selbst nach Antibiotika-Therapie im Gewebe persistieren. Die klinische Symptomatik der Lyme-Borreliose wird in drei Stadien eingeteilt:

#### ▪ Stadium I

Bis zu 4 Wochen nach der Infektion tritt häufig ein ringförmiges Erythem um die Einstichstelle herum auf, das sich zunehmend auf der Haut ausbreitet und im Zentrum langsam wieder verblaßt (Erythema migrans). Über Schmerzen oder Juckreiz wird nicht berichtet, vielmehr kommen allgemeine Symptome wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen oder Lymphknotenschwellungen hinzu. Ein Lymphozytom findet sich typischerweise an Ohrläppchen, Mamille oder Skrotum. Es kann jedoch oftmals nicht eindeutig einem Stadium zugeordnet werden.

#### ▪ Stadium II

Wochen bis Monate nach einem unbehandelten Frühstadium manifestiert sich die Erkrankung und Spätfolgen sind zu befürchten. Die Erreger breiten sich in der Haut aus und erreichen über Blut- und Lymphwege die verschiedenen Organe. Folglich treten Lähmungserscheinungen, Gehirn-, Herzmuskel- und Hirnhautentzündungen auf. Die Lyme-Karditis äußert sich in Rhythmusstörungen, v.a. mit AV-Block unterschiedlichen Grades. Leitsymptome im Stadium II sind die lymphozytäre Meningoradikulitis Bannwarth als Bestandteil der Neuroborreliose, Fazialisparese, lymphozytäre Pleozytose mit Eiweißvermehrung im Liquor oder bei Gelenkmanifestation Arthritiden bzw. bei Hautmanifestation die Akrodermatitis cutis benigna Bäfverstedt.

#### ▪ Stadium III

Im Stadium III werden chronische Krankheitserscheinungen der Lyme-Borreliose erkennbar. Dabei machen sich bei Betroffenen Lähmungen, Gedächtnis-, Konzentrations- und Verhaltensstörungen bemerkbar, aber auch die Lyme-Arthritis wird manifest. Durch eine chronische Unterversorgung der Haut entsteht das klassische Bild einer Akrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. Dabei imponiert ein zigarettenpapierdünnes, gefältetes Aussehen der Haut mit livider Verfärbung und plastischem Hervortreten der Gefäße.

Gelegentlich lassen sich auch sklerodermieartige Symptome beobachten. Als sehr seltenes Merkmal des Stadiums III gilt die chronische Borrelien-Enzephalomyelitis, welche überwiegend das ZNS befällt und als Para- oder Tetraparesen imponiert.

Anhand von Untersuchungen an Patientenmaterial und umfangreichen Studien zeigte sich, daß bestimmte klinische Erscheinungen überwiegend von einer Spezies hervorgerufen werden, wie z.B.: Lyme-Arthritis von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, Neuroborreliose von *Borrelia garinii* oder Akrodermatitis chronica atrophicans von *Borrelia afzelii* [12, 110, 198, 206, 211]. Die Anwendbarkeit dieser Speziesassoziation mit bestimmten klinischen Erscheinungen der Borreliose auf Europa ist noch nicht vollständig gesichert.

*Diagnostik:* [195, 212, 164]

Der mikroskopische Nachweis des Erregers ist sehr schwierig, so daß serologischen Antikörper-Nachweisverfahren große Bedeutung zukommt. Im Einsatz sind der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT), der Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay-Test (ELISA), der indirekte Hämagglutinationstest (IHA), sowie der Western-Blot. Als Untersuchungsmaterial eignen sich Blut- oder Liquorproben. Die klinische Diagnose ist für eine frühzeitige Behandlung am wichtigsten, da sich Antikörper erst nach 4 bis 8 Wochen nachweisen lassen und im Stadium I bei 50% der Patienten fehlen. Ein negativer serologischer Befund schließt bei kurzer Krankheitsdauer eine Borreliose nicht aus, ist dagegen unwahrscheinlich bei Spätmanifestationen.

*Therapie:* [164]

Zur Zeit gibt es noch keine einheitliche Therapieempfehlung. Zum Einsatz kommen für 10 bis 30 Tage Tetrazykline (v.a. Doxyzyklin), Penizillin G, Zephalosporine, Amoxizillin oder Erythromyzin. Ein Verschwinden der klinischen Symptome ist nicht mit einer Heilung gleichzusetzen, weshalb eine langfristige ärztliche Kontrolle empfehlenswert ist.

*Prophylaxe:* [164]

Aufgrund der großen Heterogenität der Spezies ist noch keine wirksame Impfung verfügbar. Schwerpunkt der Vakzine-Entwicklung ist die Überwindung der immunologischen Variabilität und der Variation der Expression von Osp-Proteinen. Besonders der Schutz vor Zeckenstichen, sowie die Früherkennung der Infektion und die richtige Behandlung müssen als bedeutsam angesehen werden, um chronische Manifestationen der Borreliose zu verhindern.

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Im Ilmtal wurden bereits verschiedene Untersuchungen zum Vorkommen von Borrelien durchgeführt. Da die Borrelien-übertragenden Zecken auch Vektoren für Ehrlichien sein können, war es Zielstellung der vorliegenden Arbeit, eine Prävalenz der mit Ehrlichien und / oder Borrelien infizierten Zecken in der Region aufzuzeigen.

Ehrlichien-spezifische DNA von Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Genogruppe, welche die humane granulozytäre Ehrlichiose verursachen, soll in den gesammelten Zecken nachgewiesen werden. Bevor ein Antikörpernachweis als Routineverfahren eingeführt wird, ist es hilfreich, etwas über das Vorkommen des Erregers in seinem Hauptüberträger Zecke zu wissen und Ärzte auf eventuell davon ausgehende Gefahren aufmerksam zu machen. Daher ist diese Studie als Vorarbeit für die Beurteilung der Ehrlichiose beim Menschen anzusehen. Gibt es Ehrlichien infizierte Zecken auch in Thüringen und wenn ja, mit welcher Häufigkeit? Erfahrungsgemäß sind mehr Adulte als Nymphen infiziert. Es erhob sich die Frage, ob sich dies auch für das beschriebene Fanggebiet bestätigen läßt.

Für die Borreliose ist Thüringen bekanntes Endemiegebiet. Aus diesem Grund war es sinnvoll, die gesammelten *Ixodes ricinus* Zecken auch auf eine Infektion mit Borrelien zu untersuchen. Folgende Fragen galt es zu beantworten: Sind wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Entwicklungsstadien im Durchseuchungsgrad auffällig und kann eine in der Literatur beschriebene Abhängigkeit der Infektionsrate saisonalbedingt [48] bestätigt werden? Zur Beantwortung dieser Frage wurden Männchen, Weibchen und Nymphen aus insgesamt drei Habitaten im Ilmtal zu unterschiedlichen Jahreszeiten gefangen. Es gibt Vermutungen, daß bestimmte Spezies bevorzugt verschiedene Organmanifestationen der Borreliose hervorrufen [12, 110, 198, 211]. Deshalb erschien es vorteilhaft, zusätzlich eine Einordnung in einzelne Genospezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes vorzunehmen. Diese Speziesdifferenzierung wäre in einer zukünftigen Studie an Patienten mit verschiedenen Manifestationen der Borreliose zur Bestätigung der Assoziation der einzelnen Spezies mit bestimmten Formen der Erkrankung erforderlich.

Die Untersuchungen auf beide Erreger sollte die Verdeutlichung der schon bekannten Möglichkeit der Koinfektion und die nähere Beleuchtung der Frage nach einem Zusammenhang des gemeinsamen Auftretens erlauben.

### 3. Methoden

#### 3.1. Allgemeine Methoden

##### 3.1.1. Sammeln der Zecken

Im Zeitraum von Mai 1999 bis September 2000 wurden 305 Zecken in drei Gebieten aus dem Ilmtal gesammelt. Belvedere befindet sich in der Nähe von Weimar, Bad Berka etwa 13 km südlich davon und Dienststedt weitere 17 km in südlicher Richtung (*Abb. 3.1.1.*). Die Habitate Bad Berka und Dienststedt waren jeweils an Waldrändern gelegen, während das Fanggebiet Belvedere aus dem Randbereich eines Parkes mit Buschvegetation und Übergang zu einem Buchenwald bestand. Durch die Flaggmethode, auch Fahnenmethode (englisch:"dragging") genannt, war es möglich, Zecken in nüchternem Zustand aufzulesen. Es wurde ein weißes, nach Buttersäure riechendes Lakentuch (ca 80 cm x 150 cm) verwendet, mit dem die Tiere abgestriffen werden konnten. Die Schlepphöhe sollte variieren, um möglichst alle Entwicklungsstadien zu erfassen. Es wurde immer an den gleichen Stellen und immer in der Zeit zwischen 9.00 Uhr und 14.00 Uhr gesammelt, in unterschiedlicher Anzahl Männchen, Weibchen und Nymphen aus jedem Bereich (*Tab. 3.1.1.*). Larven wurden nicht in die Untersuchungen einbezogen, da Ehrlichien nicht transovariell übertragen werden und ein wesentliches Ziel dieser Arbeit der Nachweis von Ehrlichien, sowie der Koinfektion mit Ehrlichien und Borrelien war. Das Sammeln der Zecken erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Ernährungswissenschaften in Jena.

Die Tiere wurden einzeln in je ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen mit einem feuchtem Grashalm zur Aufbewahrung gegeben. Protokollierte Daten waren Fangdatum, Fundort, Geschlecht und Entwicklungsstadium. Die Zecken lagerten bis zum Beginn der weiteren Untersuchungen bei -80°C, da bei -20°C ein Überleben wie in freier Natur möglich gewesen wäre.

	Männchen	Weibchen	Nymphen	Total
Bad Berka	13	18	114	145
Belvedere	7	7	66	80
Dienststedt	8	9	63	80
Total	28	34	243	305

**Tab. 3.1.1.:**

Die Tabelle zeigt die Anzahl der gesammelten Zecken in jedem der drei Habitate in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium.



- 1 Belvedere
- 2 Bad Berka
- 3 Dienststedt

**Abb. 3.1.1.:**

In der Abbildung ist die Lage der drei Untersuchungsgebiete im Ilmtal anhand einer Thüringen-Karte veranschaulicht.

3.1.2. DNA-Extraktion aus der Zecke

Die gesamte DNA-Extraktion wurde mit dem "High Pure PCR Template Preparation Kit" von Roche Diagnostics (Cat. No. 1 796 828) durchgeführt. Nach dem Auftauen erfolgte eine Übertragung der Tiere in je ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß. Da man die gesuchten Erreger im Magen-Darm-Trakt vermutet, war der Versuch mit einer Pinzette den Darminhalt auszupressen, zweckmäßig. Allerdings gestaltete sich dieses Vorgehen bei den Nymphen wegen ihrer geringen Größe recht schwierig. In diesen Fällen war das Präparationsgebiet unter dem Mikroskop besser sichtbar. Zur Verflüssigung des Untersuchungsmaterials diente 200 µl PBS, zum Lösen und Verdauen zellulärer Bestandteile kamen 200 µl "Lysis Buffer" und 40 µl Proteinase K (Konzentration 20 mg / ml) zum Einsatz. Proteinase K ist eine

hochaktive Endopeptidase, die bei langer Inkubationszeit Proteine in Aminosäuren spalten kann und endogene DNA'sen hemmt. Nach Mischen der zugegebenen Substanzen inkubierte der Reaktionsansatz bei 55°C im Thermoblock über Nacht. Zur Kontrolle der Sauberkeit der DNA-Extraktion wurde der Extraktionsprozess mit PBS-Puffer in einer Säule durchlaufen. Am nächsten Tag wurden 200 µl "Binding Buffer" hinzugefügt. Nach gutem Mischen und 10 minütiger Inkubation bei 72°C waren noch 100 µl Isopropanol erforderlich, bevor die gesamte Probe in das obere Reservoir eines "High Pure Filter Tube" mit Auffanggefäß pipettiert werden konnte. Mit Hilfe des Bindungspuffers wurden die Nukleinsäuren an den Filter im Tube gebunden. Nach Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge für 1 Minute bei ca. 8000 rpm, Verwerfen des Durchlaufes und Aufsetzen des Tubes in ein neues Auffanggefäß dienten 500 µl "Inhibitor Removal Buffer" zur Entfernung PCR-hemmender Kontaminationen. Anschließend erfolgten zwei Waschläufe mit je 500 µl Waschpuffer, um die Nukleinsäuren von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Extrakten zu reinigen. Zwischen den einzelnen Schritten waren Zentrifugation und Verwendung neuer Tubes zum Auffangen notwendig. Zum Schluß setzte man das High Pure Filter Tube auf ein sauberes 1,5 ml Nuklease-freies Reaktionsgefäß und konnte mit 200 µl Elutionspuffer die gebundene DNA vom Filter lösen. Eine möglichst optimale Elution erforderte das Vorheizen des Puffers auf 72°C im Thermoblock und eine 2 minütige Einwirkungszeit bei Zimmertemperatur vor dem Zentrifugieren. Die auf diesem Wege isolierte DNA kam direkt in der PCR zum Einsatz oder wurde bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

### 3.1.3. DNA-Extraktion aus den Borrelien-Vergleichsstämmen

Frau Dr. B. Wilske, Max-von-Pettenkofer-Institut München, stellte je 1 ml eines Stammes der humanpathogenen Spezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato:

- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto
- *Borrelia afzelii*
- *Borrelia garinii*

zur Verfügung.

- *Borrelia valaisiana*

konnte durch die Unterstützung von Prof. Dorn des Institutes für Ernährungswissenschaften in Jena zusätzlich in die Untersuchungen einbezogen werden. Dabei betrug die Erregerdichte etwa je 100 000 Zellen / ml. Aus je 200 µl erfolgte die Extraktion mit dem "High Pure PCR

Template Preparation Kit" (Roche Diagnostics, Cat. No. 1 796 828). Zum Zellverdau wurden 200 µl "Lysis Buffer" und 40 µl Proteinase K (Konzentration 20 mg / ml) hinzugefügt. Das entstandene Gemisch inkubierte bei 55°C übernacht. Das weitere Vorgehen am folgenden Tag geschah analog zur DNA-Extraktion aus der Zecke. Auch wurde hierbei eine Säule für eine PBS-Probe verwendet, um sauberes Arbeiten aufzuzeigen.

#### 3.1.4. Photometrische Konzentrationsmessung der extrahierten DNA

Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, so daß die gemessene optische Dichte bei dieser Wellenlänge nach dem Lambert-Beer-Gesetz zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden kann.

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

E: Extinktion

$\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient

c: Konzentration

d: Schichtdicke

Bei gleicher Schichtdicke ist die Konzentration der zu messenden Substanz direkt proportional zur Extinktion.

Anhand von Eichkurven entspricht eine  $OD_{260nm}$  von 1,0 bei Einzelstrang DNA und RNA einer Konzentration von 40 µg / ml, bei Doppelstrang DNA 50 µg / ml und bei Oligonukleotiden 33 µg / ml. Für Oligonukleotide ist dieser Wert sehr variabel, in Abhängigkeit der jeweiligen Kettenlänge.

Die Seitenketten aromatischer AS absorbieren Licht bei 280 nm Wellenlänge. Anhand des Quotienten aus  $OD_{260 nm}$  und  $OD_{280 nm}$  erhält man ein Maß für Reinheit der DNA oder RNA. Bei einer sauberen DNA- oder RNA-Präparation sollte der Quotient zwischen 1,8 für ssDNA oder RNA und 2,0 für dsDNA liegen. Kleinere Werte zeigen eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen an.

Die Messungen wurden mit dem Gerät Ultraspec 2000 (Pharmacia Biotech Biochrom Science Park) und einer Küvette aus Quarzglas (Typ No. 105.202-05) vorgenommen.

### 3.1.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Prinzip: [170]

Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt in zu geringen Mengen vorliegende DNA-Abschnitte enzymatisch vervielfältigen kann. Die entsprechenden DNA-Bereiche werden dabei von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt. Ein Zyklus beinhaltet drei Schritte: Im ersten Schritt wird die DNA bei etwa 94°C denaturiert. Anschließend erfolgt eine Abkühlung auf die Annealing-Temperatur, welche v.a. für die Bindung der jeweiligen Primer an den komplementären Strang der DNA optimal sein sollte. Nach Anstieg der Temperatur auf 72°C wird in einem dritten Schritt von den 3' Enden der Primer beginnend mit Hilfe einer DNA-Polymerase und Nukleotiden (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) der Komplementärstrang in der Richtung 5' zu 3' synthetisiert. Diesen Vorgang, der mehrfach wiederholt wird, bezeichnet man als Extension. Die Anzahl der so polymerisierten Sequenzfragmente steigt mit zunehmender Zyklenzahl exponentiell an.

Die verwendete Polymerase stammt aus dem Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus*. Sie ist hitzestabil und hält daher Temperaturen bis 95°C aus, ohne dabei zu denaturieren.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Schritte vor dem Start der PCR an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Das weitere Arbeiten nach dem Amplifizieren (z.B. Gel-Elektrophorese) fand in einem anderen Raum statt. Für jeden Arbeitsraum stand ein gesonderter Pipettensatz zur Verfügung.

Der PCR-Ansatz:

Entsprechend der Probenanzahl wurde unter der Sterilbank ein Master-Mix hergestellt. Darin enthalten waren dNTPs, 10 x Puffer (Konzentrat mit MgCl<sub>2</sub> und KCl), Primer, steriles Aqua dest. und eine DNA-Polymerase (TAKARA Taq™). Der Mastermix wurde vor Zugabe der zu untersuchenden DNA auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Die Amplifikationsreaktion wurde in einem Thermozykler (Perkin Elmer GeneAmp PCR-Sytem 2400) durchgeführt. Mit dem Gerät war eine Bearbeitung von 24 Proben in einem PCR-Durchlauf möglich. Diese setzten sich zusammen aus 21 DNA-Materialien, einer Positivkontrolle, einer Negativ-PBS-Kontrolle für die Sauberkeit der DNA-Präparation und einer Negativ-Master-Mix-Kontrolle zum Ausschluß von Verunreinigungen in der PCR.

### 3.1.6. Agarose-Gel-Elektrophorese

Prinzip:

Mit Hilfe der Elektrophorese können Nukleinsäuren im nativen Zustand entsprechend ihrer Molekülgröße und Ladung getrennt werden. Nukleinsäuren sind aufgrund der Zucker-Phosphat-Bindungen negativ geladen und wandern daher zur Anode. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle bewegen sich im Agarosegel indirekt proportional zum  $\log_{10}$  ihres Molekulargewichtes. Da die Porengröße des Gels sich umgekehrt proportional zur Konzentration verhält, verwendet man niedrig konzentrierte Gele zur Trennung großer Fragmente (große Poren) bzw. hoch konzentrierte Gele bei kleinen Fragmenten (kleine Poren), um eine optimale Auftrennung im jeweiligen Bereich zu erzielen.

Durch Zugabe des grün fluoreszierenden Farbstoffes SYBR-Green I (FMC Bio Produkts) in das Gel (5  $\mu$ l / 100 ml) und den Probenpuffer Orange G-Glyzerin-EDTA ( $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$ , Sigma Chemical Co) werden die DNA-Banden unter UV-Licht (Image Master<sup>®</sup>VDS Pharmacia Biotech) bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm sichtbar. Dies wird möglich durch die Bindung des Farbstoffes an die doppelhelikale DNA unter Bildung eines Nukleinsäure-Farbstoffkomplexes. Zum Vergleich und zur Beurteilung der Molekülgröße diente ein DNA-Marker, welcher Banden mit bekannten Fragmentgrößen aufzeigt.

### 3.1.7. Sequenzierung

Die PCR-Bande in entsprechender Höhe wurde mit einem scharfen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mit dem QIA quick Gel Extraktions Kit (250) der Firma Qiagen (Cat.No. 28706). Nach Wiegen des Gelausschnittes in einem farblosen Tube wurde QG Puffer im Verhältnis 6:1 für ein 2%-iges Agarose-Gel hinzugefügt, z.B. 600  $\mu$ l QG Puffer auf 100 mg Agarose-Gel. Anschließend war eine Inkubation bei 50°C erforderlich bis sich das Gel vollständig gelöst hatte. Zur Unterstützung des Lösungsvorganges diente das Vortexen der Proben alle zwei bis drei Minuten während der Inkubation. Der QG Puffer beinhaltet einen pH-Indikator, welcher bei einem  $pH \leq 7,5$  gelb ist und orange oder violett bei höheren Werten. Dadurch sollte der optimale pH-Bereich für die Bindung der DNA leicht erkennbar sein. Wichtig war die Farbe des Lösungsgemisches, welche gelb sein sollte, ähnlich der Farbe des QG Puffers. Bei orangem oder violetter Farbton konnte durch Zusatz von Natriumacetat (3 M, pH 4,6) ein

Farbumschlag zu gelb erzielt werden. Die Adsorption der DNA an die QIAquick Membran ist nur bei einem pH-Wert von  $\leq 7,5$  effizient.

Um die DNA zu binden, wurden die Proben in eine vorbereitete QIAquick spin Säule mit einem 2 ml Tube als Auffanggefäß gegeben und für 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgte ein Waschvorgang mit 0,75 ml PE Puffer pro QIAquick Säule in der ersten Runde und mit 0,25 ml PE Puffer pro QIAquick Säule in der zweiten Runde. Ein erneutes Zentrifugieren für 1 Minute bei mehr als 10000 rpm nach Verwurf des Durchlaufes war erforderlich, um Reste des Ethanols im PE Puffer zu entfernen. Das Auffanggefäß konnte jetzt verworfen und durch ein neues, sauberes 1,5 ml Tube ersetzt werden.

Je 50  $\mu$ l steriles Aqua dest. ermöglichten die Elution der DNA. Das einminütige Zentrifugieren wurde erst nach einer Einwirkzeit von 2 bis 5 Minuten durchgeführt, um die Elution zu optimieren. Das mittlere Elutionsvolumen betrug etwa 48  $\mu$ l von 50  $\mu$ l. Zur Konzentrierung des DNA-Produktes wurde das Volumen im 1,5 ml Tube für etwa 20 Minuten in einer Vakuumzentrifuge auf etwa 20  $\mu$ l eingengt.

In einer Didesoxy-Sequenzreaktion erfolgte die Markierung der zu sequenzierenden DNA-Abschnitte. Für diese Reaktion mittels des "Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit"s von PE Biosystems wurden Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Bei der mit thermostabiler Taq-Polymerase durchgeführten DNA-Elongation führten die der Polymerisierungsreaktion beigemischten, fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide zu einem statistischem Kettenabbruch nach dem Prinzip von Sanger [168].

Anschließend wurde eine Ethanol-fällung der markierten DNA-Fragmente durchgeführt. Dabei wurden zuerst 80  $\mu$ l steriles Aqua dest., 10  $\mu$ l 3M Natriumacetatlösung und 250  $\mu$ l Et hanol (99,8%) zum Reaktionsprodukt hinzugefügt. Dieses Gemisch mußte nach dem Vortexen bei etwa 15000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert werden. Ein Abpipettieren bzw. vorsichtiges Abgießen des Ethanols war vor dem weiteren Vorgehen erforderlich. Für den folgenden Waschvorgang dienten 200  $\mu$ l Ethanol (70%) und ein 5 minütiges Zentrifugieren. Nach Entfernen der Waschlösung wurde das Pellet 5 Minuten in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Das Produkt wurde in 25  $\mu$ l "Template Suppression Reagent" (ABI PRISM Applied Biosystems) resuspendiert. Nach Vortexen und einer kurzen Zentrifugation erfolgte eine Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C. Sofortige Abkühlung auf Eis verhinderte eine Renaturierung.

Je 10 µl diesen Materials wurden in einem Sequenzautomat (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems) analysiert. Die Analyse beruht auf dem Prinzip, daß die Didesoxynukleotide aller 4 Basen jeweils mit einem individuellen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Die markierten Fragmente werden in einem hochauflösenden, harnstoffhaltigen Sequenzgel, bei der verwendeten Apparatur mittels Kapillarelektrophorese, aufgetrennt. Die Basenabfolge der Abbruchsleiter wird lasergestützt ausgewertet. An einem Macintosh® Computer mit der speziellen Herstellersoftware werden die Rohdaten in die entsprechende Sequenz umgerechnet. Der Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen erfolgte im Internet unter der Adresse: "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>".

### 3.1.8. Statistik

Die statistische Beurteilung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der Computer-Programme Microsoft-Excel 97 (Microsoft Corporation Int.) sowie SPSS 10.0 für Windows® (SPSS Incorporation Int.) durchgeführt. Zur Ermittlung der Signifikanz von unterschiedlichen Infektionsraten für Ehrlichien oder Borrelien in *Ixodes ricinus* Zecken bezüglich Entwicklungsstadium und Habitat diente der "Fisher exact test" für dichotome Variablen. Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Für die Bewertung der saisonalen Entwicklung der Infektionsraten wurde eine lineare Trendgerade verwendet (Signifikanz bei  $p < 0,05$ ).

Bei der Berechnung der 95% Konfidenzintervalle für die Prävalenz von Ehrlichien und / oder Borrelien in *Ixodes ricinus* Zecken entsprechend ihres Entwicklungsstadiums wurde zusätzlich das Programm von Clopper, C. J., Pearson, E. S. (The use of confidence fiducal limits illustrated in the case of the binomial. Biometra 1934, 26:404-413) verwendet.

## **3.2. Ehrlichienuntersuchungen**

### **3.2.1. PCR**

Zum Nachweis der Ehrlichien wurde ein Bereich der 16 rDNA aus der gesamten extrahierten DNA jeder einzelnen Zecke mittels PCR amplifiziert. Die sichere Identifizierung der Erreger erfolgte über direkte Sequenzierung der PCR-Produkte oder Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente.

Das verwendete Primerpaar "GER3 / GER4" für ein kleines Fragment von 151 bp aus dem 16S rRNA Gen wurde erstmals von Anderson et al. 1991 beschrieben [5]. Innerhalb der 3 Ehrlichien Genogruppen sollte eine Spezifität für Ehrlichien der *E. phagocytophila* Gruppe gewährleistet (*Abb. 4.2.1.a, Tab. 3.2.1.*) sein. Die Primer "e16Slarge.fw / e16Slarge.rv" für ein großes Fragment von 943 bp wurden als Ergänzung anhand der Sequenz des 16S rRNA Genabschnittes von HGE-agent in der GenBank (Accession No.: U02521) zusätzlich ausgewählt. Der Nachweis des großen Fragmentes erfolgte nur bei den Isolaten, die nach der Sequenzierung des kleinen Fragmentes als Ehrlichien-positiv identifiziert wurden. Der Primer e16Slarge.rv entspricht fast vollständig dem Komplementärstrang zu GER3. Daher kommt es in diesem DNA-Abschnitt zu einer Sequenzüberlappung, die in der *Abb. 3.2.1.* markiert ist. Die Sequenzen des kleinen und großen PCR-Fragmentes konnten nach der Analyse zusammengefügt werden, wobei sich eine maximale Länge von 1074 bp ergab. In jeder PCR wurden eine Positivkontrolle, eine Negativ-PBS-Kontrolle und eine Negativ-Aqua dest.-Kontrolle verwendet. Isolierte DNA eines mit Ehrlichien infizierten Patienten aus Minnesota diente als Positivkontrolle. Als Negativ-PBS-Kontrolle diente eine Probe, die aus der DNA-Extraktion stammte, bei der mit PBS der Säulenreinigungsprozeß simuliert worden war. Die PBS Probe sollte die Reinheit der DNA-Extraktion aufzeigen. Zum Nachweis der Sauberkeit der PCR diente die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle, wobei anstelle von DNA Aqua dest. zu dem Master-Mix hinzugefügt wurde.

```

5'                                     e16Slarge.fw →
  1 TCCTGGCTCA GAACGAACGC TGGCGGCAAG CTTAACACAT GCAAGTCGAA CGGATTATTC
 61 TTTATAGCTT GCTATAAAGA ATAGTTAGTG GCAGACGGGT GAGTAATGCA TAGGAATCTA
121 CCTAGTAGTA TGGGATAGCC ACTAGAAATG GTGGGTAATA CTGTATAATC CCTGCGGGGG
181 AAAGATTTAT CGCTATTAGA TGAGCCTATG TTAGATTAGC TAGTTGGTAG GGTAAAGGCC
241 TACCAAGGCG ATGATCTATA GCTGGTCTGA GAGGATGATC AGCCACACTG GAACTGAGAT
301 ACGGTCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GGACAATGGG CGCAAGCCTG
361 ATCCAGCTAT GCCGCGTGAG TGAGGAAGGC CTTAGGGTTG TAAAACCTCTT TCAGTAGGGA
421 AGATAATGAC GGTACCTACA GAAGAAGTCC CGGCAAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA
481 TACGGAGGGG GCAAGCGTTG TTCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGCATGTA GGCGGTTTCGG
541 TAAGTTAAAG GTGAAATGCC AGGGCTTAAC CCTGGAGCTG CTTTTAATAC TGCCAGACTA
601 GAGTCCGGGA GAGGATAGCG GAATTCCTAG TGTAGAGGTG AAATTCGTAG ATATTAGGAG
661 GAACACCAGT GGCGAAGGCG GCTATCTGGT CCGGTAAGTGA CGCTGAGGTG CGAAAGCGTG
721 GGGAGCAAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG TCCACGCTGT AAACGATGAG TGCTGAATGT
781 GGGGATTTTT TATCTCTGTG TTGTAGCTAA CGCGTTAAGC ACTCCGCCTG GGGACTACGG
841 TCGCAAGACT AAAACTCAAA GGAATTGACG GGGACCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT
901 TTAATTCGAT GCAACGCGAA AAACCTTACC ACTCCTTGAC ATGGAGATTA GATCCTCTT
      GER3 →
961 AACGGAAGGG CGCAGTTCGG CTGGATCTCG CACAGGTGCT GCATGGCTGT CGTCAGCTCG
      ← GER4*
1021 TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA CGAGCGTAAC CCTCATCCTT AGTTGCCAGC
1081 GGGTAAAGCC GGGCACTTTA AGGAAACTGC CAGTGGTAAA CTGGAGGAAG GTGGGGATGA
1141 TGTCAAGTCA GCACGGCCCT TATGGGGTGG GCTACACACG TGCTACAATG GTGACTACAA
1201 TAGGTTGCAA TGTCGCAAGG CTGAGCTAAT CCGTAAAAGT CATCTCAGTT CGGATTGTCC
1261 TCTGCAACTC GAGGGCATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC GTGGATCAGC ATGCCACGGT
1321 GAATACGTTT TCGGGTCTTG TACACACTGC CCGTCACGCC ATGGGAATTG GCTTAACTCG
1381 AAGCTGGTGC GCCAACCGAA AGGAGGCAGC CATTTAAGGT TGGGTCAGTG ACT      3'

```

\* Mit diesem Zeichen gekennzeichnete Primer sind komplementär dargestellt.

### Abb. 3.2.1.: Ehrlichien-PCR

Dargestellt ist eine Partialsequenz des 16S ribosomal RNA Gens von HGE-agent (Access. No: U02521). Die Primer GER3, GER4, e16Slarge.fw und e16Slarge.rv sind in der jeweiligen Richtung 5' zu 3' (→) oder 3' zu 5' (←) eingezeichnet. Die Sequenzüberlappung zwischen dem kleinen und großen Fragment ist in der Abbildung markiert.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
GER3 ("forward"), 100 pmol	5'>TAG ATC CTT CTT AAC GGA AGG GCG<3'
GER4 ("reverse"), 100 pmol	5'>AAG TGC CCG GCT TAA CCC GCT GGC<3'
e16Slarge.fw ("forward"); 100 pmol	5'>CAA GCT TAA CAC ATG CAA GTC GAA C<3'
e16Slarge.rv ("reverse"); 100 pmol	5'>CCC TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT C<3'

**Tab. 3.2.1.:**

Die Tabelle zeigt die eingesetzten Konzentrationen und Sequenzen der in der Ehrlichien-PCR des kleinen und großen Fragmentes verwendeten Primer.

Die PCR wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz:</u>	<u>1x:</u>	<u>45 µl Master Mix</u>	<u>PCR-Bedingungen:</u>	kleines Fragment	grosses Fragment
	+ 5 µl DNA		Initiale	94°C, 5 min	94°C, 5 min
			Denaturierung		
10 x Puffer mit MgCl <sub>2</sub> und KCl	5,0 µl		Denaturierung	94°C, 1 min	94°C, 1 min
Primer 1 (GER3, e16Slarge.fw)	0,5 µl		Annealing	50°C, 1 min	51°C, 1 min
Primer 2 (GER4, e16Slarge.rv)	0,5 µl		Extension	72°C, 1 min	72°C, 1 min
Aqua dest.	30,75 µl		Finale Extension	72°C, 7 min	72°C, 7 min
Taq Polymerase	0,25 µl		Zyklen	40	40
DNA	5,0 µl				

### 3.2.2. Gel-Elektrophorese

➤ kleines Fragment:

Zur Trennung der PCR-Produkte wurde ein 2%-iges Agarose-Gel (1,5g Agarose / 75 ml) gekocht und nach Zugabe des Farbstoffes SYBR-Green I gegossen.

➤ großes Fragment:

Die Trennung der PCR-Amplifikate des großen Fragmentes erfolgte mit einem 1,5%-igen Agarose-Gel (0,75g Agarose / 50 ml).

Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer und als Probenpuffer Orange G-Glycerin-EDTA. Die Beurteilung des Gels erfolgte unter UV-Licht. Banden in entsprechender Höhe wurden ausgeschnitten und sequenziert. Die erwarteten Fragmentgrößen von 151 bp für das kleine Fragment und 943 bp für das große Fragment ließen in der Elektrophorese die Vermutung auf eine Ehrlichien-Infektion zu. Dies konnte durch die anschließende Sequenzierung in den meisten Proben bestätigt werden.

### 3.2.3. Klonierung der PCR-Fragmente

▪ Zielstellung:

Die direkte Sequenzierung des kleinen Fragmentes ergab mit den Primern "GER3 / GER4" oft schlecht lesbare Sequenzen mit geringen Leseweiten. Um die vollständige Sequenz des kleinen PCR-Fragmentes zu erhalten, wurde dieses nach Ligation in das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) mit nachfolgender Transformation in den *E. coli*-Stamm TG1 kloniert. Die Sequenzierung aus dem Plasmid ergab sowohl eindeutig quantitativ, als auch qualitativ verbesserte Ergebnisse. Deshalb wurde das 943 bp umfassende PCR-Fragment sofort kloniert und anschließend direkt aus dem Plasmid sequenziert. Neben dem Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) und TG1-Zellen wurden auch das Plasmid pDrive (Qiagen) und EZ kompetente Zellen (Qiagen) verwendet (Abb. 3.2.3.). Sowohl das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T, als auch pDrive besitzen eine Ampizillinresistenz, die eine Selektion der Plasmid tragenden Bakterien nach der Transformation erlaubt.

▪ Ligation:

Die Ligationsreaktion dient der Verknüpfung von DNA-Fragmenten. Die Plasmide pGEM<sup>®</sup>-T oder pDrive wurden vom Hersteller mit T- oder U-Überhängen im Klonierungsort geliefert. Die isolierten PCR-Fragmente besaßen durch die Verwendung der Taq-Polymerase A-Überhänge an den 3' Enden. So gelang eine direkte Klonierung der PCR-Fragmente in die

offenen, T- oder U-Überhänge besitzenden Plasmide. Die Bedingungen der Ligation waren für beide Plasmide etwas verschieden:

*pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector*

Reaktionsansatz: 15 µl

2x Rapid Ligation Buffer 7,5 µl

PCR-Produkt 5,0 µl

*pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* 1,0 µl

T4 DNA Ligase 1,5 µl

Inkubation über Nacht 4 °C

*pDrive Cloning Vector*

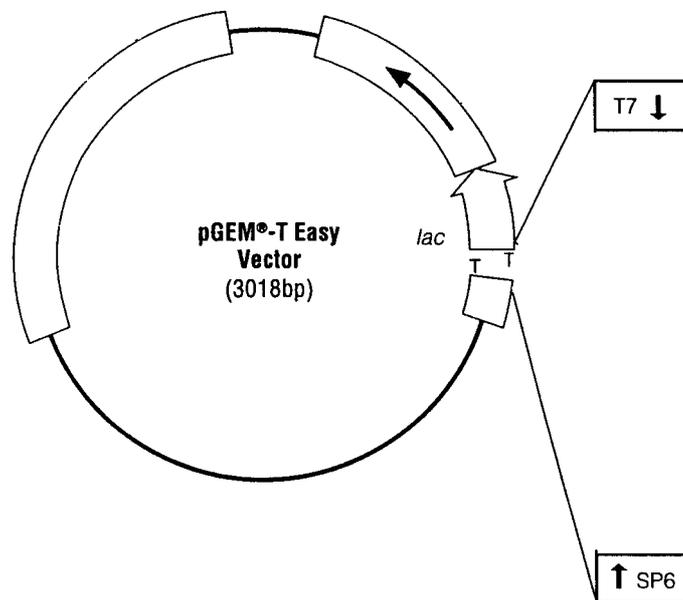
Reaktionsansatz: 10 µl

Ligation Master Mix, 2x 5,0 µl

PCR-Produkt 4,0 µl

*pDrive Cloning Vector* 1,0 µl

Inkubation 2 h 16 °C



**pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector**

**Abb. 3.2.3.:**

Die Abbildung zeigt die Struktur des verwendeten Plasmids "pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector", wobei der "pDrive Cloning Vector" diesem sehr ähnlich ist.

- Transformation in den *E. coli*-Stamm TG1 oder EZ kompetente Zellen:

Kompetente, plasmidfreie TG1-Zellen, die bei -70°C gelagert waren, kamen zunächst für 5-10 Minuten auf Eis und wurden zu je 30-40 µl portioniert. Zu einem Aliquot Zellen wurde die gesamte Ligrationsreaktion pipettiert und nach Mischen 20 Minuten auf Eis inkubiert. In diesem Schritt lagerte sich das Plasmid an die Außenseite der Zellmembranen. Zur Erhöhung der Permeabilität, erfolgte über 45-50 Sekunden eine Erwärmung auf 42°C im Wasserbad und

eine anschließende 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 450 µl LB-Flüssigmedium wurden die Bakterien innerhalb von 1,5 bis 2 h bei 37 °C unter Schütteln in einem Thermoschüttler bei 600 rpm inkubiert. Etwa 150 µl dieses Zellgemisches wurden auf eine Agarplatte ausgestrichen. Die verwendeten Agarplatten enthielten 100 µl / ml Ampizillin, 0,002 M IPTG und 40 µl X-Gal.

Bei der Transformation in EZ kompetente Zellen empfiehlt der Hersteller nur 5 µl des Ligationsgemisches einzusetzen mit nachfolgender Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Auf die Agarplatte wurden 100 µl SOC-Medium unmittelbar vor dem Ausspateln in das Transformationsgemisch pipettiert.

▪ Anfertigen der Minipreps:

Im Fall der verwendeten Plasmide wird beim Einbau eines PCR-Fragmentes der Leserahmen des Galaktosidase-Gens unterbrochen. Es entstehen auf einem Chromogen-haltigen Agar weiße und blaue Bakterienkolonien, wobei weiße das Vorhandensein eines eingebauten Inserts anzeigen, weil die Spaltung des Farbstoffsubstrates X-Gal durch Inaktivierung des Galaktosidasegens ausbleibt. In unserem Fall wurden von jeder Agarplatte 10 weiße Kolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt und in ein vorbereitetes Reagenzglas mit je 1 ml LB-Flüssigmedium mit Ampizillinzusatz gegeben. In diesem Medium vermehrten sich die Bakterien innerhalb von 3 bis 4 h unter Schütteln bei 37°C. Ein Eintrüben zeigte die Zunahme der Bakterienzahl an. Zweihundert µl der Kultur wurden entnommen und 30 µl Glycerin (87%) hinzugefügt. Die bei -20°C eingefrorene Glycerinkultur diente als Reserve für nachfolgende Analysen. Aus den verbleibenden 800 µl der gewachsenen Bakterien schloß sich die Plasmidisolierung mit Hilfe des "SEQ LAB Plasmid Miniprep Kit"s (Seq Lab) an. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 200 bis 300 µl 0,1 M Tris-Puffer gewaschen, um Reste des LB-Mediums zu beseitigen. Fünfzig µl RNA'se haltiger Resuspensionspuffer dienten zur Resuspension der Zellen und zur Verdauung der RNA. Die Lyse erfolgte mit 100 µl Lysispuffer ("Ly-Buffer"). Danach wurden 75 µl Neutralisationspuffer ("NE Buffer") zugegeben. Beide Puffer sollten jeweils vor dem nächsten Schritt 5 Minuten einwirken. Durch erneutes Zentrifugieren für 30 Minuten wurden Zellbestandteile abgetrennt. Die DNA befand sich gelöst im Überstand. Dieser wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und Ethanol 99,8% bis zu einer Endkonzentration von 70% zugegeben. Die gefällte DNA wurde für 20 Minuten zentrifugiert und das Präzipitat mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen. Nach Zentrifugieren für 5 bis 10 Minuten wurde das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und schließlich in 20 µl Aqua dest. aufgenommen.

▪ Gel-Elektrophorese der Plasmidklone:

Zur Analyse wurden die Plasmidklone in einem 1,5%-igem Agarose Gel (1,5g Agarose / 100ml) aufgetrennt. Der verwendete pGEM-Marker enthielt bereits Probenpuffer, so daß zusätzlich beim Auftragen kein Orange G erforderlich war.

Ziel dieser Elektrophorese sollte die Kontrolle der gelungenen Plasmidisolierung sein, bevor sich die weiteren Schritte anschlossen. Ein Plasmid mit enthaltenem 16S rRNA Genabschnitt mußte die Größe von etwa 3018 bp für den pGEM<sup>®</sup>-T und 3850 bp für den pDrive Vektor haben plus die Größe des eingebauten Inserts von 151 bp oder 943 bp. Klone mit entsprechend hohen Molekulargewichten wurden weiter mittels PCR und Sequenzierung analysiert.

▪ Plasmid-PCR:

Durch eine PCR mit den Plasmidprimern T7 und Sp6 (*Tab. 3.2.3.a*) wurde die Insertion der PCR-Fragmente in die verwendeten Plasmide geprüft.

<u>Primer:</u>	<u>Sequenz:</u>
T7 ("forward")	5'>TCG CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA<3'
Sp6 ("reverse")	5'>ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC<3'

**Tab. 3.2.3.a:**

In der Tabelle sind die Sequenzen der verwendeten Plasmidprimer dargestellt.

Diese PCR erfolgte unter den folgenden Reaktionsbedingungen:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>PCR-Bedingungen:</u>	
	1x: 49,5 µl Master Mix		
	+ 0,5 µl Plasmidisolat		
dNTP's	8,0 µl	Initiale Denaturierung	94°C, 5 min
10 x Puffer mit MgCl <sub>2</sub> und KCl	5,0 µl	Denaturierung	94°C, 1 min
Primer 1 (Sp 6)	1,0 µl	Annealing	50°C, 1 min
Primer 2 (T7)	1,0 µl	Extension	72°C, 1 min
Aqua dest.	34,25 µl	Finale Extension	72°C, 7 min
Taq Polymerase	0,25 µl	Zyklen	40
Plasmidisolat	0,5 µl		

▪ Gel-Elektrophorese der Plasmid-PCR Isolate:

Die Analyse der Plasmid-PCR-Produkte wurde in einem 2%-igem Gel (2,0 g Agarose / 100 ml) durchgeführt.

Ein Vergleich der entstandenen Plasmid-PCR-Produkte hinsichtlich der Molekulargewichte erfolgte mit den 16S rDNA-Fragmenten der ursprünglichen Ehrlichien-PCR.

▪ Sequenzierung:

Zur Sequenzierung des kleinen PCR-Fragmentes diente das Primerpaar "GER3 / GER4" und zur Sequenzierung des großen PCR-Fragmentes kamen die Primer "e16Slarge.fw / e16Slarge.rv" zum Einsatz (*Tab. 3.2.1.*→Seite 26).

Die in die Plasmidvektoren eingebauten PCR-Fragmente wurden mit Hilfe der Primer T7 und Sp6 sequenziert, welche ca 50-80 bp vor und hinter dem jeweiligen Insertionsort auf dem Plasmid lokalisiert sind. Die Sequenzreaktion wurde mit dem "Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit" von Applied Biosystem durchgeführt.

Die Reaktionen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>Reaktionsbedingungen:</u>	
PCR-Produkt	7,0 µl	Initiale Denaturierung	96°C
aus dem Gel		Denaturierung	96°C, 10 s
"BigDye	2,0 µl	Annealing	50°C, 5 s
Terminator"		Extension	60°C, 4 min
Primer 1 oder 2	1,0 µl	Finale Extension	4°C, 7 min
		Zyklen	25

Um den mittleren Teil des großen Fragmentes vollständig zu analysieren waren zusätzlich die Primer erlmitte.fw und erlmitte.rv erforderlich (*Tab. 3.2.3.b*). Für die Synthese der Primer dienten die Zwischenergebnisse der Sequenzierung des großen PCR-Fragmentes als Vorlage. Diese wurden anstelle der Plasmidprimer T7 und Sp6 in der Sequenzreaktion eingesetzt.

<u>Primer:</u>	<u>Sequenz:</u>
erlmitte.fw ("forward")	5'>GAT TTA TCG CTA TTA GAT GAG CCT ATG<3'
erlmitte2.rv ("reverse")	5'>CAC AGA GAT AAA AAA TCC CCA CAT TCA G<3'

**Tab. 3.2.3.b:**

Die Tabelle stellt die Sequenzen der verwendeten Primer für die Sequenzierung des mittleren Abschnittes der großen Fragmentes dar.

Aufgrund GC-reicher Regionen in diesem Abschnitt erwiesen sich die Zugabe von DMSO und etwas veränderte Reaktionsbedingungen als günstig, um eine gute Sequenz zu erhalten.

Reaktionsbedingungen für die GC-reichen Regionen im Mittelstück des 943 bp PCR-Fragmentes:

<u>Reaktionsansatz:</u> 1x: 20 µl	<u>Reaktionsbedingungen:</u>
PCR-Produkt 6,0 µl	Initiale Denaturierung 98°C, 5 min
aus dem Gel	Denaturierung 98°C, 10 s
BigDye 8,0 µl	Annealing 53°C, 5 s
Terminator	Extension 60°C, 4 min
Primer 1 oder 2 1,0 µl	Finale Extension 4°C, 7 min
DSMO 1,0 µl	Zyklen 25
Aqua dest. 4,0 µl	

Alle verwendeten Primer wurden ausgehend von der PCR-Konzentration für die Sequenzreaktion noch einmal 1:10 verdünnt.

### 3.3. Borrelienuntersuchungen

#### 3.3.1. PCR

Der Nachweis der Borrelien-DNA erfolgte über eine Amplifizierung eines Bereiches im OspA Gen des Erregers mit nachfolgender Speziesdifferenzierung durch RFLP. Die PCR-Strategie in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen, einer Primäramplifikation und einer sich anschließenden "semi-nested" PCR wurde vom Max-von Pettenkofer-Institut München übernommen. Für beide PCR-Reaktionen wurden in der Vorwärtsrichtung je ein "Wobble"-Primer eingesetzt, OspA-V1a, OspA-V1b in der Primäramplifizierung und OspA-V2a, OspA-V2b in der nachfolgenden "semi-nested" PCR. In der gegenläufigen Richtung wurde in beiden Fällen der Primer R1 verwendet. V1a und V1b, sowie V2a und V2b stimmten in ihrer Sequenz bis auf eine Base überein (Tab. 3.3.1.). Der "A / G"-Basenaustausch in V1a / V1b bzw. "G / A"-Basenaustausch in V2a / V2b ermöglichte die Erfassung der verschiedenen Borrelienspezies, die sich an dieser Stelle zum Teil unterscheiden. R1 hat 24 Basen, von denen sich 12 am Ende des OspA Gens befanden und 12 in der intergenischen Sequenz zwischen dem OspA und OspB Gen (Abb. 3.3.1., Abb. 4.3.1.a→Seite 56). In der 1. PCR wurden jeweils eine Positivkontrolle, eine Negativ-PBS-Kontrolle und eine Negativ-Aqua dest.-Kontrolle verwendet. In der 2. PCR kam noch eine weitere Negativ-Aqua dest.-Kontrolle hinzu.

```

5'
 1 ATGAAAAAAT ATTTATTGGG ↓1 AATAGGTCTA ATATTAGCCT TAATAGCATG TAAGCAAAAT
                               OspA-V1a →
61 GTTAGCAGCC TTGATGAGAA AAACAGCGTT TCAGTAGATT TACCTGGTGA AATGAAAGTT
                               OspA-V2b →
                               ↑2
121 CTTGTAAGCA AAGAAAAAGA CAAAGATGGT AAATACAGTC TAATGGCAAC AGTAGACAAG
181 CTAGAGCTTA AAGGAACTTC TGATAAAAGC AACGGTTCTG GAACACTTGA AGGTGAAAAA
241 TCTGACAAAA GTAAAGCAAA ATTAACAATT TCTGAAGATC TAAGTAAAAAC CACATTTGAA
301 ATTTTCAAAG AAGATGGCAA AACATTAGTA TCAAAAAAAG TAAATTCTAA AGATAAGTCA
361 TCAATAGAAG AAAAATTCAA CGCAAAAGGT GAATTATCTG AAAAAACAAT ACTAAGAGCA
421 AACGGAACCA GGCTTGAATA CACAGAAATA AAAAGCGATG GAACCGGAAA AGCTAAAGAA
481 GTTTTAAAAG ACTTTGCTCT TGAAGGAACT CTAGCTGCCG ACAAACAAC ATTGAAAGTT
541 ACAGAAGGCA CTGTTGTTTT AAGCAAACAC ATTCCAAACT CTGGAGAAAT AACAGTTGAG
601 CTTAATGACT CTAACCTCTAC TCAGGCTACT AAAAAAACTG GAAAATGGGA TTCAAATACT

```

```

661 TCCACTTTAA CAATTAGTGT GAATAGCAAA AAAACTAAAA ACATTGTATT TACAAAAGAA
721 GACACAATAA CAGTACAAAA ATACGACTCA GCAGGCACCA ATCTAGAAGG CAACGCAGTC
                                ← R1*
781 GAAATTAATAA CACTTGATGA ACTTAAAAAC GCTTTAAAAAT AA 3'
    
```

\* Primer ist komplementär dargestellt.

↓<sup>1</sup> An dieser Stelle besteht der Basenaustausch zwischen OspA-V1a→A und OspA-V1b→G.

↑<sup>2</sup> An dieser Stelle besteht der Basenaustausch zwischen OspA-V2a→G und OspA-V2b→A.

**Abb. 3.3.1.:** Borrelien-PCR

Diese Abbildung zeigt das OspA Gen von *Borrelia burgdorferi* s.l. am Beispiel von *Borrelia garinii* (PBi, Access.No: X80257). Die verwendeten Primer der Primäramplifizierung und der "semi-nested" PCR sind im Gen unterstrichen, der Basenaustausch zwischen OspA-V1a und OspA-V1b bzw. OspA-V2a und OspA-V2b ist markiert. Von dem Primer R1 sind nur 12 Basen dargestellt, wobei das Triplett "TAA" den Aminosäure-Schlüssel für das Ende des OspA Gens kodiert. Der Bereich zwischen den Primern OspA-V1a und R1 umfaßt das PCR-Produkt der Primäramplifizierung, während zwischen OspA-V2b und R1 das Amplifikat der "semi-nested" PCR zu erkennen ist.

<u>Primer:</u>	<u>Sequenz:</u>
Primäramplifizierung: OspA-V1a ("forward"), 10 pmol	5'>GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC<3'
OspA-V1b ("forward"); 10 pmol	5'>GGG GAT AGG TCT AAT ATT AGC<3'
R1 ("reverse"); 10 pmol	5'>CAT AAA TTC TCT TTA TTT TAA AGC<3'
"semi-nested" PCR: OspA-V2a ("forward"); 100 pmol	5'>TTC AGT AGA TTT GCC TGG TG<3'
OspA-V2b ("forward"); 100 pmol	5'>TTC AGT AGA TTT ACC TGG TG<3'
R1 ("reverse"); 100 pmol	5'>CAT AAA TTC TCT TTA TTT TAA AGC<3'

**Tab. 3.3.1.:**

Die Tabelle zeigt die Konzentrationen und Sequenzen der in der PCR verwendeten Primer.

Die beiden PCR-Reaktionen wurden unter den folgenden Reaktionsbedingungen ausgeführt:

**Primärampifikation:**

<u>Reaktionsansatz:</u> 1x: 45 µl Master Mix		<u>PCR-Bedingungen:</u>	
	+ 5 µl DNA		
dNTP's	8,0 µl	Initiale	94°C, 5 min
		Denaturierung	
10 x Puffer mit	5,0 µl	Denaturierung	94°C, 45 sec
MgCl <sub>2</sub> und KCl		Annealing	48°C, 45 sec
Primer 1	0,5 µl	Extension	72°C, 1min
(OspA-V1a)		Finale Extension	72°C, 7 min
Primer 2	0,5 µl	Zyklen	30
(OspA-V1b)			
Primer 3	0,5 µl		
(R1)			
Aqua dest.	30,25 µl		
Taq Polymerase	0,25 µl		
DNA	5,0 µl		

**"semi-nested" PCR:**

<u>Reaktionsansatz:</u> 1x: 45 µl Master Mix		<u>PCR-Bedingungen:</u>	
	+ 5 µl DNA		
dNTP's	8,0 µl	Initiale	94°C, 5 min
		Denaturierung	
10 x Puffer mit	5,0 µl	Denaturierung	94°C, 45 sec
MgCl <sub>2</sub> und KCl		Annealing	50°C, 45 sec
Primer 1	0,5 µl	Extension	72°C, 1min
(OspA-V2a)		Finale Extension	72°C, 7 min
Primer 2	0,5 µl	Zyklen	30
(OspA-V2b)			
Primer 3	0,5 µl		
(R1)			
Aqua dest.	30,25 µl		
Taq Polymerase	0,25 µl		
Amplifikat	5,0 µl		

### 3.3.2. Gel-Elektrophorese

Zur Trennung der PCR-Produkte wurde ein 1,5%-iges Gel (1,5 g Agarose / 100 ml) verwendet. Die erwarteten Fragmentgrößen betragen für das erste PCR-Produkt 813 bp und für das zweite PCR-Produkt 744 bp. Von den Amplifikaten der positiven Proben der "semi-nested" PCR wurde ein Restriktionsverdau zur Typisierung der Genospezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes durchgeführt.

### 3.3.3. Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme spalten DNA an definierten kurzen Sequenzregionen, wodurch sich bei der DNA von genetisch nicht identischen Organismen unterschiedliche Restriktionsmuster ergeben. Diesen Effekt nennt man Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP). Er lässt sich u.a. zur Differenzierung von nahe verwandten Spezies nutzen. Zur Unterscheidung der Borrelienspezies wurden die Enzyme Kpn 21, Bgl II, Sfu I, Ssp I und AlwN I verwendet (Tab. 3.3.3.a, Tab. 3.3.3.b, Tab 3.3.3.c). Aufgrund lokaler Sequenzunterschiede zwischen *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. b.* sensu stricto und *B. valaisiana* besitzen die einzelnen Spezies im OspA Gen individuelle Restriktionsorte für nur ein oder mehrere der verwendeten Enzyme (Abb. 3.3.3.→Seite 38).

Als Vergleich dienten je ein Stamm der verschiedenen Genospezies:

- *Borrelia afzelii* PKo, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: S48322
- *Borrelia garinii* PBi, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: X80257
- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PKa, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: X80182
- *Borrelia valaisiana* VS116, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: AB016979

Diese wurden vom Max-von-Pettenkofer-Institut in München bereitgestellt, wobei der Vergleichsstamm der Spezies *Borrelia valaisiana* vom Institut für Ernährungswissenschaften in Jena zur Verfügung gestellt wurde.

	Kpn 21(Acc III)	Bgl II	Sfu I (Asu II)	Ssp I
<i>B. burgdorferi</i> SG 1	744 bp	744 bp	744 bp	471;267 bp
<i>B. afzelii</i> SG 2	744 bp	744 bp	541;207 bp	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 3	374, 370 bp	703;45 bp	744bp	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 4	744 bp	561;187 bp	744 bp	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 5	494;200;54 bp	744 bp	744 bp	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 6	374;254;120 bp	744 bp	744 bp	744 bp

**Tab. 3.3.3.a:**

Die Arbeit mit den 4 Enzymen Kpn 21, Bgl II, Sfu I und Ssp I basierte auf der Grundlage der Protokolle vom Max-von-Pettenkofer-Institut München, die eine Speziesdifferenzierung anhand des entstehenden Bandenmusters der jeweiligen Spezies vornahmen. SG 1 entspricht *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, SG 2 *Borrelia afzelii* und SG 3 bis SG 6 *Borrelia garinii*.

	AlwN I
<i>B. burgdorferi</i> SG 1	744 bp
<i>B. afzelii</i> SG 2	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 4	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 5	744 bp
<i>B.garinii</i> SG 6	744 bp
<i>B.valaisiana</i>	404;365 bp

**Tab. 3.3.3.b:**

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit ein charakteristischer Restriktionsort für das Enzym AlwN I gefunden. Dieses Enzym schneidet spezifisch nur die DNA von *Borrelia valaisiana*, die DNA der anderen Borrelien-Spezies bleibt mit einer Bande in der Höhe von 744 bp unverdaut.

Enzym	Kpn 21 (BspM II)	Bgl II	Sfu I (Asu II)	Ssp I	AlwN I
Schnittstelle	TCCGGA	AGATCT	TTCGAA	AATATT	CAGNNCTG
	5' → 3'				

**Tab. 3.3.3.c:**

Die 5 verwendeten Enzyme spalten spezifisch an den aufgeführten Basenabfolgen, die als Restriktionsorte fungieren. Beim AlwN I bedeutet N, daß dafür jede der Basen A, T, C oder G stehen kann. Das Zeichen  $\rightarrow$  markiert den charakteristischen Restriktionsort des jeweiligen Enzyms.

	5'								
	1								51
afzpcr	TTCAGTAGAT	TTGCCTGGTG	AGATGAAAAGT	TCTTGTAAGT	AAAGAAAAAG				
garpcr	TTCAGTAGAT	TTACCTGGTG	AAATGAAAAGT	TCTTGTAAGC	AAAGAAAAAG				
sspcr	TTCAGTAGAT	TTGCCTGGTG	AAATGAAAAGT	TCTTGTAAGC	AAAGAAAAAG				
valpcr	TTCAGTAGAT	TTACCCGGCG	AAATGAAAAGT	TCTTGTAAGC	AAAGAAAAAG				
	51								100
afzpcr	ACAAAGACGG	TAAGTACAGT	CTAAAGGCAA	CAGTAGACAA	GATTGAGCTA				
garpcr	ACAAAGATGG	TAAATACAGT	CTAATGGCAA	CAGTAGACAA	GCTAGAGCTT				
sspcr	ACAAAGACGG	CAAGTACGAT	CTAATTGCAA	CAGTAGACAA	GCTTGAGCTT				
valpcr	ACAAAGACGG	TAAATACAGT	CTAGTGGCAA	CAGTAGACAA	AGTTGAGCTT				
	101								150
afzpcr	AAAGGAACTT	CTGATAAAGA	CAATGGTTCT	GGGGTGCTTG	AAGGTACAAA				
garpcr	AAAGGAACTT	CTGATAAAAAG	CAACGGTTCT	GGAACACTTG	AAGGTGAAAA				
sspcr	AAAGGAACTT	CTGATAAAAA	CAATGGATCT	GGAGTACTTG	AAGGCGTAAA				
valpcr	AAAGGAACTT	CTGATAAAAA	CAATGGTTCT	GGAACACTTG	AAGGCGTAAA				
	151								200
afzpcr	AGATGACAAA	AGTAAAGCAA	AATTAACAAT	TGCTGACGAT	CTAAGTAAAA				
garpcr	ATCTGACAAA	AGTAAAGCAA	AATTAACAAT	TTCTGAAGAT	CTAAGTAAAA	Bgl II			
sspcr	AGCTGACAAA	AGTAAAGTAA	AATTAACAAT	TTCTGACGAT	CTAGGTCAAA				
valpcr	AGATGACAAA	AGTAAAGTAA	AATTAACAAT	TTCTGATGAT	CTAGGCGAAA				
	201								250
afzpcr	CCACATTCGA	ACTTTTCAAA	GAAGATGGCA	AAACATTAGT	GTC AAGAAAA	Sfu I			
garpcr	CCACATTTGA	AATTTTCAAA	GAAGATGGCA	AAACATTAGT	ATCAAAAAAA				
sspcr	CCACACTTGA	AGTTTTCAAA	GAAGATGGCA	AAACACTAGT	ATCAAAAAAA				
valpcr	CCAAACTTGA	AACTTTTCAAA	GAAGATGG..	.AACATTAGT	GTC AAGAAAA				
	251								300
afzpcr	GTAAGTTCTA	AAGACAAAAC	ATCAACAGAT	GAAATGTTCA	ATGAAAAAAG				
garpcr	GTA AATTCTA	AAGATAAGTC	ATCAATAGAA	GAAAAATTCA	ACGCAAAAAG				
sspcr	GTA AACTTCCA	AAGACAAGTC	ATCAACAGAA	GAAAAATTCA	ATGAAAAAAG				
valpcr	GTA AATTTCA	AAGACAAGTC	TTTCACAGAA	GAAAAATTCA	ATGAAAAAAG				
	301								350
afzpcr	TGAATTGTCT	GCAAAAACCA	TGACAAGAGA	AAATGGAACC	AAACTTGAAT				
garpcr	TGAATTATCT	GAAAAAACAA	TACTAAGAGC	AAACGGAACC	AGGCTTGAAT				
sspcr	TGAAGTATCT	GAAAAAATAA	TAACAAGAGC	AGACGGAACC	AGACTTGAAT				
valpcr	TGAAGTGTCT	GAAAAAATAC	TAACAAGATC	AAACGGAACT	ACACTTGAAT				
	351								400
afzpcr	ATACAGAAAT	GAAAAGCGAT	GGAA...CCG	GAAAAGCTAA	AGAAGTTTTA				
garpcr	ACACAGAAAT	AAAAGCGAT	GGAA...CCG	GAAAAGCTAA	AGAAGTTTTA				
sspcr	ACACAGGAAT	TAAAAGCGAT	GGAT...CTG	GAAAAGCTAA	AGAGGTTTTA				
valpcr	ACTCACAAT	GACAGATGCT	GAAAATGCTA	CAAAAGCAGT	AGAAACTCTA	AlwN I			
	401								450
afzpcr	AAA...AACT	TTACTCTTGA	AGGAAAAGTA	GCTAATGATA	AAGTAACATT				
garpcr	AAA...GACT	TTGCTCTTGA	AGGAACTCTA	GCTGCCGACA	AAACAACATT				
sspcr	AAA...GGCT	ATGTTCTTGA	AGGAACTCTA	ACTGCTGAAA	AAACAACATT				
valpcr	AAAAATGGCA	TTAAGCTTCC	AGGAAATCTT	GTAGGCGGAA	AAACAACATT				
	451								500
afzpcr	GGAAGTAAAA	GAAGGAACCG	TTACTTTAAG	TAAGGAAATT	GCAAAATCTG				
garpcr	GAAAGTTACA	GAAGGCACTG	TTGTTTTAAG	CAAAACACATT	CCAAACTCTG				
sspcr	GGTGGTTAAA	GAAGGAACTG	TTACTTTAAG	CAAAAATATT	TCAAAATCTG	Ssp I			
valpcr	GAAAATCACA	GAAGGTACTG	TTACTTTAAG	CAAGCACATT	GCAAAATCTG				

	501				550
afzpcr	GAGAAGTAAC	AGTTGCTCTT	AATGACACTA	ACACTACTCA	GGCTACTAAA
garpcr	GAGAAATAAC	AGTTGAGCTT	AATGACTCTA	ACTCTACTCA	GGCTACTAAA
sspcr	GGGAAGTTTC	AGTTGAACTT	AATGACACTG	ACAGTAGTGC	TGCTACTAAA
valpcr	GAGAAGTAAC	AGTTGAAATT	AACGACACTT	CAAGCACTCC	AAATACTAAA
	551				600
afzpcr	AAAAC TGGCG	CATGGGATTC	AAAAACTTCT	ACTTTAACAA	TTAGTGT TAA
garpcr	AAAAC TGGAA	AATGGGATTC	AAATACTTCC	ACTTTAACAA	TTAGTGT GAA
sspcr	AAAAC TGCAG	CTTGGAATTC	AGGCAC TTCA	ACTTTAACAA	TTACTGT TAA
valpcr	AAAAC TGGAA	AATGGGATGC	AAGAAATTCA	ACTTTAACAA	TTATTGT TGA
	601				650
afzpcr	CAGCAAAAAA	ACTACACAAC	TTGTGTTTAC	TAAACAAGAC	ACAATAACTG
garpcr	TAGCAAAAAA	ACTAAAAACA	TTGTATTTAC	AAAAGAAGAC	ACAATAACAG
sspcr	CAGTAAAAAA	ACTAAAGACC	TTGTGTTTAC	AAAAGAAAAC	ACAATTACAG
valpcr	CAGCAAAAAA	AAGACAAAAC	TTGTATTTAC	AAAACAAGAC	ACAATAACAG
	651				700
afzpcr	TACAAAAATA	CGACTCCGCA	GGTACCAATT	TAGAAGGCAC	AGCAGTCGAA
garpcr	TACAAAAATA	CGACTCAGCA	GGCACCAATC	TAGAAGGCAA	CGCAGTCGAA
sspcr	TACAACAATA	CGACTCAAAT	GGCACCAAAT	TAGAGGGGTC	AGCAGTTGAA
valpcr	TACAAAGCTA	TAACCCTGCA	GGCAACAAGC	TAGAAGGTAC	AGCAGTTGAA
	701				750
afzpcr	ATTAAACAC	TTGATGAACT	TAAAAACGCT	TTGAAATAA	.....
garpcr	ATTAAACAC	TTGATGAACT	TAAAAACGCT	TTAAATAA	.....
sspcr	ATTACAAAC	TTGATGAAAT	TAAAAACGCT	TTAAATAA	.....
valpcr	ATTAAACAC	TTCAAGAACT	TAAAAACGCT	TTAAATAAG	GAGAATTTAT
	751		762		
afzpcr	.....	.....	..		
garpcr	.....	.....	..		
sspcr	.....	.....	..		
valpcr	GAAACAATAT	TTACTAGGAT	TT		

3'

### Abb. 3.3.3.: Restriktionsverdau

Die jeweilige Spezifität der spaltenden Enzyme und die entstandenen Fragmentgrößen werden im Vergleich der Sequenzen des OspA Gens erkennbar. An den entsprechenden Schnittstellen gibt es jeweils keine vollkommene Übereinstimmung mit einem der anderen Spezies.

Die Abbildung stellt die Spezifität der Restriktionsstellen der 4 als Positivkontrolle verwendeten Vertreter des *B. b.* sensu lato Komplexes im OspA Gen dar. Die Bezeichnungen afzpcr, garpcr, sspcr und valpcr stehen für die Amplifikate der "semi-nested" PCR von *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *Borrelia valaisiana*. Die Restriktionsorte der Enzyme identifizieren spezifisch die einzelnen Spezies: Bgl II → *B. garinii*, Sfu I → *B. afzelii*, AlwN I → *B. valaisiana* und Ssp I → *B. b.* sensu stricto. Markiert sind die Sequenzunterschiede zwischen den jeweiligen Spezies in den Restriktionsstellen.

Von jedem der Amplifikate der "semi-nested" PCR, bei dem sich im Gel eine Bande in der Höhe von 744 bp gezeigt hatte, wurden je 5 Restriktionsreaktionen angesetzt, so daß jedes Enzym anschließend gesondert beurteilt werden konnte. Dabei wurden folgende Bedingungen beim Restriktionsverdau verwendet:

<u>Restriktionsansatz</u>	<u>1x: 15 µl Restriktions-Mix</u>	<u>Restriktionsbedingungen:</u>	
	+ 5 µl Amplifikat	Thermoblock	55°C
Puffer	2,0 µl	Brutschrank	37°C
(enzymspezifisch)		Kpn 21	55°C
Aqua dest.	12,5 µl	Bgl II	37°C
Enzym (Kpn 21,	0,5 µl	Sfu I	37°C
Bgl II, Sfu I, Ssp I,		Ssp I	37°C
AlwN I)		AlwN I	37°C
Amplifikat	5,0 µl		

Die aliquotierten PCR-Proben wurden 12 bis 14 Stunden bei 37 °C (Bgl II, Sfu I, Ssp I, AlwN I) und 55 °C (Kpn 21) mit dem entsprechenden Enzym inkubiert. Diese Zeit war nicht für alle Enzyme unbedingt erforderlich, konnte aber auf alle übertragen werden, da keine unspezifischen Endonukleaseaktivitäten auftraten. Eine elektrophoretische Trennung der Reaktionsprodukte in einem 2%-igem Agarosegel ermöglichte die Zuordnung zu einer Spezies des *B. b.* sensu lato Komplexes und zeigte Koinfektionen mit mehr als einer Borrelienspezies an.

### **3.4. Materialien**

#### **3.4.1. DNA-Extraktion aus der Zecke und den Borrelien-Vergleichsstämmen:**

Reagentien:

"High Pure PCR Template Preparation Kit": Roche Diagnostics GmbH (Cat. No. 1 796 828)

Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O 99,8%), Isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O 99,7%), PBS-Puffer,

Geräte:

Pinzetten, Pipetten (Eppendorf), Vortexer (Jancke&Kunkel IKA Labortechnik), Zentrifuge (Centrifuge 5415 C eppendorf), Thermoblock (Test tube Thermostat Roth)

#### **3.4.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Reagentien:

dsDNA -aus DNA-Extraktion der Zecken  
-aus DNA-Extraktion der Borrelien-Vergleichsstämme

Aqua destillata

Geräte:

Pipetten (Finnpipette Campus), "Ultraspec 2000 UV-visible Spectrophotometer" (Pharmacia Biotech Biochrom Science Park)

#### **3.4.3. PCR**

Reagentien:

dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 2,5 mM), 10 x PCR Puffer (Konzentrat mit MgCl<sub>2</sub> und KCl), Recombinant TaqDNA Polymerase 5 units / µl (TAKARA Taq™)

Primer: Siehe *Tab.*: 3.2.1. →Seite 26, *Tab.* 3.2.3.a →Seite 30, *Tab.* 3.3.1. →Seite 34

DNA für Positivkontrollen:

- Isolierte HGE-DNA eines Patienten (Ulrike Munderloh, "College of Agriculture, University of Minnesota")
- Isolierte DNA aus den Stämmen *B. afzelii* (PKo), *B. garinii* (PBi) und *B. b.* sensu stricto (PKa) (Dr. B. Wilske, Max-von-Pettenkofer-Institut, München)
- *B. valaisiana* (Prof. Dorn, Institut für Ernährungswissenschaften, Jena)

Aqua destillata

Geräte:

Thermozykler (Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 2400 Roche Diagnostic Systems), Pipetten (Eppendorf), Zentrifuge (Centrifuge 5415 C eppendorf), Sterilbank (Heraeus Instruments GmbH)

#### 3.4.4. Gel-Elektrophorese

Reagentien:

SYBR-Green I (FMC Bio Products Rockland), Computer , Orange G-Glyzerin-EDTA (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>, SIGMA Chemical Co), 1 x TAE-Puffer, Marker: "Ampli-Size-Molecular-Ruler" 50-2000 bp (Bio Rad, 80939 München), pGEM<sup>®</sup>-Marker 36-2645 bp (Qiagen)

Geräte:

Waage (Roth Karlsruhe), Mikrowelle (Samsung Classic Collection), Elektroforesekammer (Bio-Rad Wide Mini SUB<sup>™</sup> Cell), Stromversorgungsgerät (Bio-Rad, Power Pac 3000), UV-Photogerät (Image Master<sup>®</sup> VDS Pharmacia Biotech), Computer (GREEN)

#### 3.4.5. DNA-Extraktion aus dem Gel

Reagentien:

"QIAquick Gel Extraktion Kit (250)" (Qiagen GmbH), Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Aqua dest.)

Geräte:

Pipetten (Finnpipette Campus), Stoppuhr (Digital Timer Huger), Wasserbad (E1 medingen P5E1), Vortexer (Neolab), Zentrifuge (Centrifuge 5415 C eppendorf), Vakuumzentrifuge (DNA speed Vac DNA 110 Savant)

3.4.6. Sequenzierung

Reagentien:

"Big Dye™ Terminator cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (PE Biosystems)

Primer: Siehe *Tab. 3.2.1.*→Seite 26, *Tab. 3.2.3.a*→Seite 30, *Tab. 3.2.3.b*→Seite 32

Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Aqua dest.), NaAc 3 M (pH 4,6), Ethanol (99,8%), Ethanol (70%), "Template Supression Reagent" (ABI PRISM, applied Biosystems), DMSO (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO, ≥99,5% peqlab Biotechnologie GmbH)

Geräte:

Thermostyzykler (Perkin Elmer GeneAmp PCR-System 2400, Roche Diagnostic Systems), Stoppuhr (Digital Timer Huger), Zentrifugen (Centrifuge ROTINA 35R; Centrifuge 5415 C eppendorf), Vakuumzentrifuge (DNA speed Vac DNA 110 Savant), Heizofen (Temperiergerät T15, AdW ZIMET), Pipetten (Finnpipette Campus), Sequenziergerät (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer)

3.4.7. Klonierung der PCR-Fragmente

Reagentien:

Ligation: "pGEM®-T Easy Vector System I" (Promega corporation Medison, WI, U.S.A)

"Qiagen PCR Cloning Kit<sup>plus</sup>" (Qiagen GmbH, Cat.No: 231122)

Transformation: EZ kompetente Zellen (Qiagen GmbH)

*E. coli* TG 1 kompetente Zellen

Minipreps: Plasmid-Miniprep-Kit (100) (Seq Lab Sequence Laboratories Göttingen GmbH)

SOC-Medium, LB-Medium, Ampizillin, IPTG, X-Gal, Agar-Platten, Glyzerin (87%), Ampuwa (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Aqua dest.)

Geräte:

Vortexgerät (Neolab), Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C), Pipetten (Finnpipette Campus), Stoppuhr (Digital Timer Huger), Wasserbad (E1 medingen), Thermomixer (Comfort eppendorf), Mikrowelle (DAEWOO C.R.S., concave reflex system), Sterilbank (Heraeus Instruments GmbH), Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH),

#### 3.4.8. Restriktionsverdau

Reagentien:

Restriktionsenzyme: Kpn 21 (BspMII) 10 units /  $\mu\text{l}$  (MBI Fermentas)  
Bgl II 2000 unit /  $\mu\text{l}$  (Roche Diagnostic)  
Sfu I (Asu II) 2000 units /  $\mu\text{l}$  (Roche Diagnostic)  
Ssp I 1000 units /  $\mu\text{l}$  (Roche Diagnostic)  
AlwN I 10 units /  $\mu\text{l}$  (New England BioLabs)

Aqua destillata

Geräte:

Sterilbank (Heraeus Instruments GmbH), Pipetten (Eppendorf), Thermoblock (Test tube Thermostat Roth), Brutschrank (memmert)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Photometrische Konzentrationsmessung

#### 4.1.1. DNA-Material aus der Zecke

Aufgrund der morphologischen Unterschiede von 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 Weibchen>Männchen>Nymphen. Die durchschnittlichen Konzentrationen der extrahierten DNA jeder einzelnen Zecke sind für die verschiedenen Entwicklungsstadien in *Tab. 4.1.1.* dargestellt. Es ergibt sich die Frage, ob bei geringerer Gesamt-DNA-Ausbeute die Anteile der zu untersuchten Erreger-DNA in einigen Fällen unter der Nachweisgrenze liegen können. Natürlich spielen ganz unterschiedliche innere und äußere Faktoren in den verschiedenen Entwicklungsstadien eine Rolle, denen der Infektionsgrad mit einem oder mehreren Pathogenen unterliegt.

Entwicklungsstadium	DNA-Konzentration in ng / $\mu$ l
Männchen	14-18 ng / $\mu$ l
Weibchen	22-30 ng / $\mu$ l
Nymphe	7-10 ng / $\mu$ l

**Tab. 4.1.1.:**

Die Tabelle veranschaulicht die Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung.

#### 4.1.2. DNA-Material aus den Borrelien-Vergleichsstämmen

Die DNA-Extraktion erfolgte aus den Kulturen der Borrelienstämmen, die Ertragsdichte betrug etwa  $10^5$  Zellen /  $\mu\text{l}$ .

Von *B. afzelii* PKo bei der Verwendung als Positivkontrolle mußte etwas mehr DNA eingesetzt werden, um gleich stark positive Resultate wie bei *B. garinii* PBi, *B. b. sensu stricto* PKa oder *B. valaisiana* zu erzielen. Die gemessenen Konzentrationen der extrahierten DNA zwischen den verwendeten Vergleichsstämmen unterschieden sich allerdings nur geringfügig (Tab. 4.1.2.).

Borrelienstamm	DNA-Konzentration in ng / $\mu\text{l}$
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	11 ng / $\mu\text{l}$
<i>Borrelia afzelii</i>	10 ng / $\mu\text{l}$
<i>Borrelia garinii</i>	12 ng / $\mu\text{l}$
<i>Borrelia valaisiana</i>	11 ng / $\mu\text{l}$

**Tab. 4.1.2.:**

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der DNA-Konzentrationsmessung der verwendeten Borrelien-Vergleichsstämme des *Borrelia burgdorferi sensu lato* Komplexes.

## 4.2. Ehrlichienuntersuchungen

### 4.2.1. Ergebnisse der Ehrlichien-PCR, Sequenzierung

▪ Ehrlichien-PCR:

In dieser PCR wurden zwei eng benachbarte Fragmente der 16S rDNA-Region von Vertretern der *E. phagocytophila* Genogruppe amplifiziert (Abb. 3.2.1.→Seite 25). Mit den Primern GER3 und GER4 (Tab. 3.2.1.→Seite 26) wurde das kleine 151 bp Fragment amplifiziert. Die Primer e16Slarge.fw und e16Slarge.rv, nahezu komplementär zu GER3, wurden zur Synthese

des größeren, 943 bp Fragmentes verwendet. Die Spezifität des kleinen PCR-Fragmentes für die *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe ist in *Abb. 4.2.1.a* dargestellt.

Das Alignment des entsprechenden Abschnittes aus dem 16S rRNA Gen der Erreger wurde im Internet unter der Adresse: "<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>" angefertigt.

	5'						900
851							
<i>E. canis</i>	A.	CTCAAAGG	AATTGACGGG	GACCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	
HGE-agent	A	ACTCAAAGG	AATTGACGGG	GACCCGCACA	AGCGGTGGAG	CATGTGGTTT	
<i>E. sennetsu</i>	A	ACTCAAAGG	AATTGACGGG	GACTCGCACA	AGCGGTGGAG	TATGTGGTTT	
	901						950
<i>E. canis</i>	A	AATTCGATGC	TACGCGAAAA	ACCTTACCAC	TTTTTGACAT	GAAGGT <u>CGTA</u>	→
HGE-agent	A	AATTCGATGC	AACGCGAAAA	ACCTTACCAC	TCCTTGACAT	GGAGAT <u>TAGA</u>	<u>GER3</u>
<i>E. sennetsu</i>	A	AATTCGATGC	AACGCGAAAA	ACCTTACCAT	ACCTTGACAT	GTGAT <u>CGTA</u>	
	951						1000
<i>E. canis</i>	T	CCCTCCTAA	<b>CAGGGGGAGT</b>	CAGTTCGGCT	GGACCTTACA	CAGGTGCTGC	
HGE-agent	T	CCTTCTTAA	<u>CGGAAGGGCG</u>	CAGTTCGGCT	GGATCTCGCA	CAGGTGCTGC	
<i>E. sennetsu</i>	T	CCCTCTGAA	<b>GGGAGGGAGT</b>	CAGTTCGGCT	GGATCCAACA	CAGGTGTTGC	
	1001						1050
<i>E. canis</i>	A	TGGTTGTTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTAAAG	TCCCGCAACG	
HGE-agent	A	TGGCTGTTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTAAAG	TCCCGCAACG	
<i>E. sennetsu</i>	A	TGGCTGTTCG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTAAAG	TCCCGCAACG	
	1051						1100
<i>E. canis</i>	A	GC GCAACCC	TCATTCCTTAG	<u>TTACCAACAG</u>	<u>GTAATGCTGG</u>	GCACTCTAAG	←
HGE-agent	A	GC GTAACCC	TCATCCTTAG	TTGCCAGCGG	<u>GTAAAGCCGG</u>	<u>GCACTTTAAG</u>	<u>GER4*</u>
<i>E. sennetsu</i>	A	GC GCAACCC	TCATCCTTAG	TTGCCAGC.G	<u>GTTCTGGCCGG</u>	<u>GAACTTTAAG</u>	
	1101						1150
<i>E. canis</i>	G	AAACTGCCA	GTGATAAACT	GGAGGAAGGT	GGGGATGATG	TCAAATCAGC	
HGE-agent	G	AAACTGCCA	GTGGTAAACT	GGAGGAAGGT	GGGGATGATG	TCAAGTCAGC	
<i>E. sennetsu</i>	G	AAACTGCCA	GTGACAAGCT	GGAGGAAGGT	GGGGACGACG	TCAAGTCATC	
							3'

\* Primer ist komplementär dargestellt.

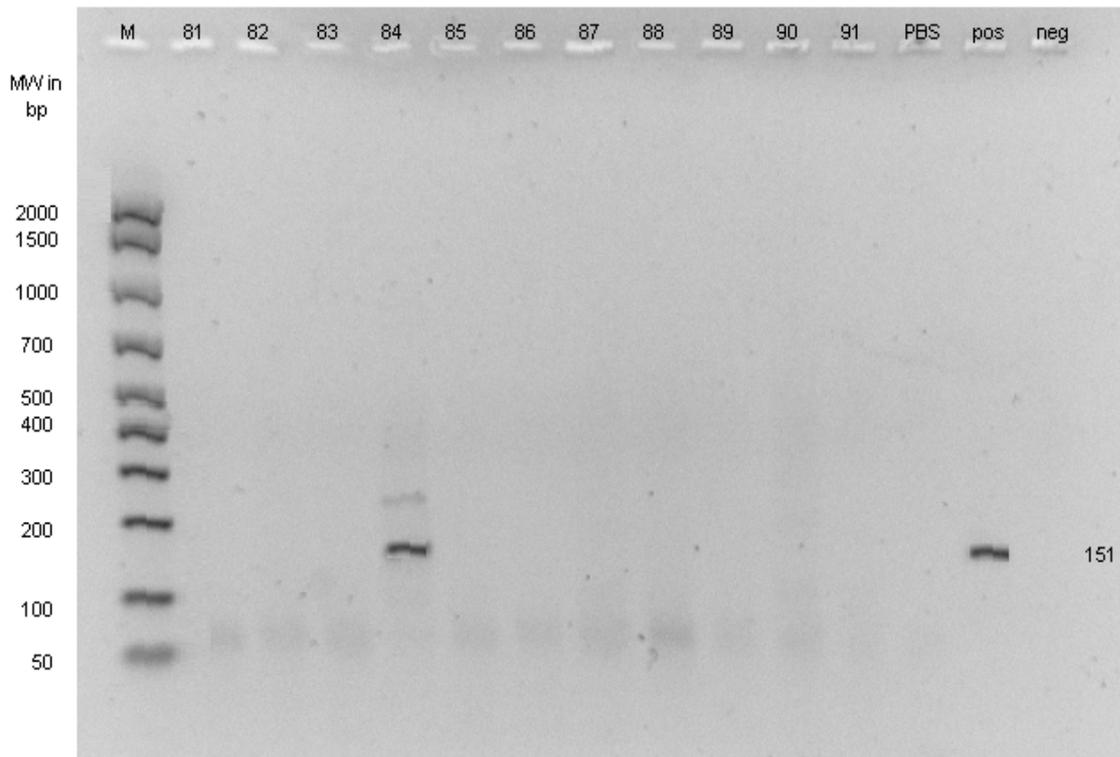
**Abb. 4.2.1.a:** Spezifität der Primer für die *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe

Zur Darstellung der Primerspezifität wurde jeweils ein Vertreter aus den Genogruppen I-III ausgewählt.

Die Sequenzen von *E. canis* (Accession No: AF162860), als Vertreter der *Ehrlichia-canis*-Gruppe (Gruppe I), HGE-agent (Accession No: U02521) aus der *Ehrlichia-phagocytophila* Gruppe (Gruppe II) und *E. sennetsu* (Accession No: M73225) aus der *Ehrlichia-sennetsu* Gruppe (Gruppe III) aus der NCBI-Datenbank wurden für das Alignment verwendet.

Die eingezeichneten Primer des kleinen PCR-Fragmentes GER3 und GER4 sind in ihrer jeweiligen DNA-Syntheserichtung 5' zu 3' (→) oder 3' zu 5' (←) dargestellt. Die hervorgehobenen Basen in der Sequenz von *E. canis* und *E. sennetsu* verdeutlichen die Sequenzunterschiede in den Primerbereichen.

Von den 305 untersuchten Zecken zeigten sich nach der PCR zur Amplifikation des kleinen Fragmentes im Agarose-Gel bei 16 Proben Banden in der Höhe von etwa 151 bp wie auch bei der immer mitgeführten Positivkontrolle. Ein Beispiel eines Elektrophorese-Gels zeigt *Abb. 4.2.1.b*. Es konnten allerdings nur 7 der 16 Proben mittels Sequenzierung als eindeutig Ehrlichien-positiv zugeordnet werden. Von diesen 7 Proben ließ sich auch das benachbarte große 943 bp PCR-Fragment amplifizieren (*Abb. 4.2.1.c*), was die Diagnose "Ehrlichien-positiv" noch einmal unterstreicht.

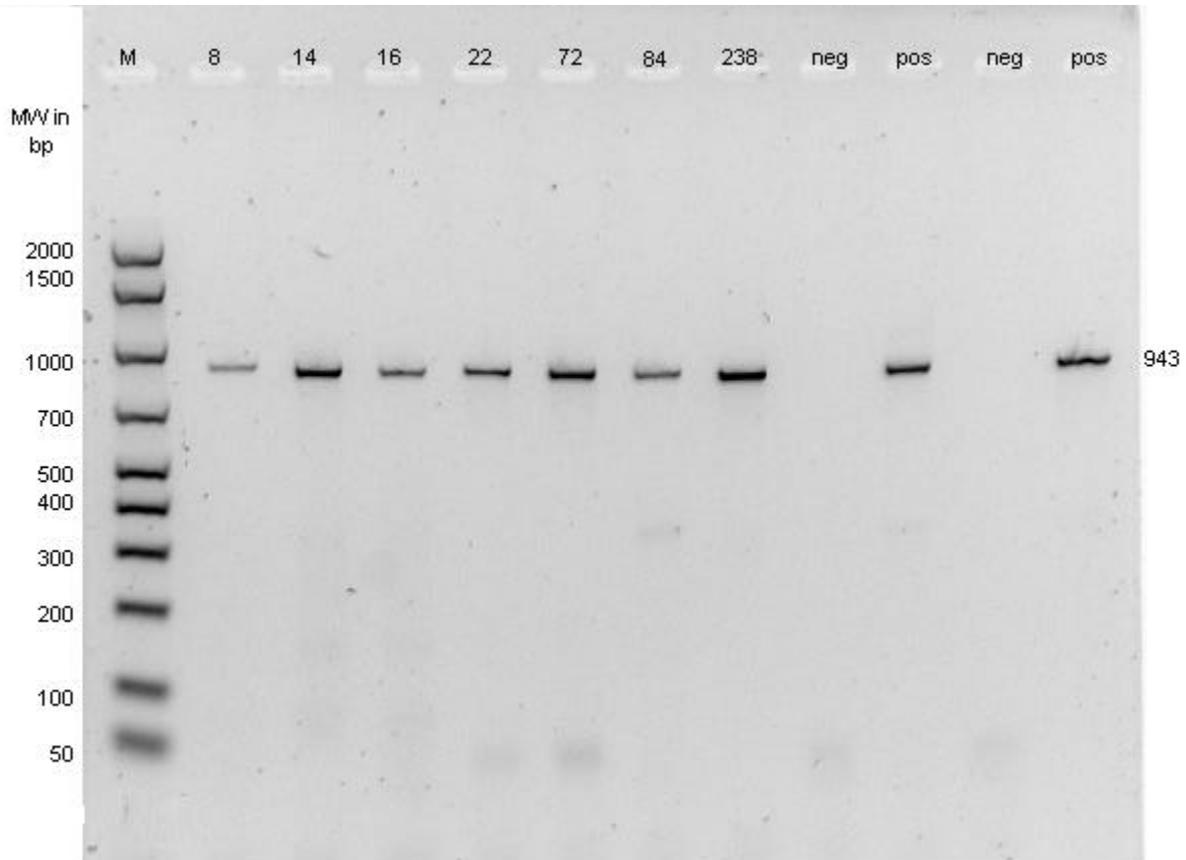


**Abb. 4.2.1.b:** kleines PCR-Fragment

M bezeichnet den verwendeten Marker (Ampli-Size-Molekular-Ruler) mit Banden in der Höhe von 50 bis 2000 bp.

Die dargestellten Proben 81-83 und 85-91 sind negativ, während sich bei der Probe 84 eine positive Bande im Gel zeigt. Diese liegt auch in der erwarteten Höhe von etwa 151 bp. Sowohl die Negativ-PBS-Kontrolle als auch die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle sind negativ. Eine positive Vergleichsbande der Positivkontrolle eines mit HGE-agent infizierten Patienten ist in der Höhe von 151 bp erkennbar.

Die PCR des großen Fragmentes wurde nur von den 7 bereits als positiv identifizierten Proben durchgeführt.



**Abb. 4.2.1.c:** großes PCR-Fragment

M bezeichnet den verwendeten Marker (Ampli-Size-Molekular-Ruler) mit Banden in der Höhe von 50 bis 2000 bp.

Die dargestellten Proben 8, 14, 16, 22, 72, 84 und 238 sind als positiv in der Sequenzierung des kleinen Fragmentes identifiziert worden. Bei den Amplifikaten der PCR des großen Fragmentes zeigt sich im Elektrophorese-Gel Banden in der Höhe von etwa 943 bp. Die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle ist negativ, während eine positive Vergleichsbande der Positivkontrolle eines mit HGE-agent infizierten Patienten in der Höhe von 943 bp erkennbar ist.

▪ Sequenzierung:

Bei den 16 Proben mit einem positiven 151 bp PCR-Produkt ergab die Sequenzierung allerdings nur bei 7 Proben eine gesicherte Zuordnung zu Ehrlichien. In den übrigen 9 PCR-positiven Proben traten keine eindeutigen Sequenzen aufgrund von Sequenzüberlagerungen auf. Außerdem wurden DNA-Sequenzen von *Drosophila melanogaster* (Access.No:

AC007752), *Trichosporon penicillatum* DNA (Access. No: D89650.1) oder *Myxococcus xanthus* (Access.No: AF285263) identifiziert. Daher taucht die Frage auf, wie spezifisch die PCR des kleinen Fragmentes wirklich ist und ob sich die PCR des großen Fragmentes mit den in dieser Arbeit erstmals verwendeten Primern nicht besser für nachfolgende Untersuchungen im Bereich des 16S rRNA Gens eignet. Der Gedanke kann anhand dieser Studie nicht weiter verfolgt werden, da nur die in der 151 bp PCR als positiv identifizierten Proben in der 943 bp PCR eingesetzt wurden, wobei keine unspezifischen Sequenzen auftraten.

Im Sequenzvergleich der 7 Ehrlichien-positiven Proben nach direkter Sequenzierung des 151 bp PCR-Produktes unter der Internetadresse: "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>" zeigte sich die Zugehörigkeit der Erreger zur *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe, wobei jedoch eine nähere Differenzierung in *Ehrlichia platys*, *Ehrlichia equi* oder HGE-agent nicht möglich war. Die Darstellung eines Alignments anhand der Probe 8, die Sequenzergebnisse der verwendeten Positivkontrolle eines mit HGE-agent infizierten Patienten aus Minnesota und aller anderen positiven Proben sind im Anhang zu finden (Abb. 7.1. →Seite 91).

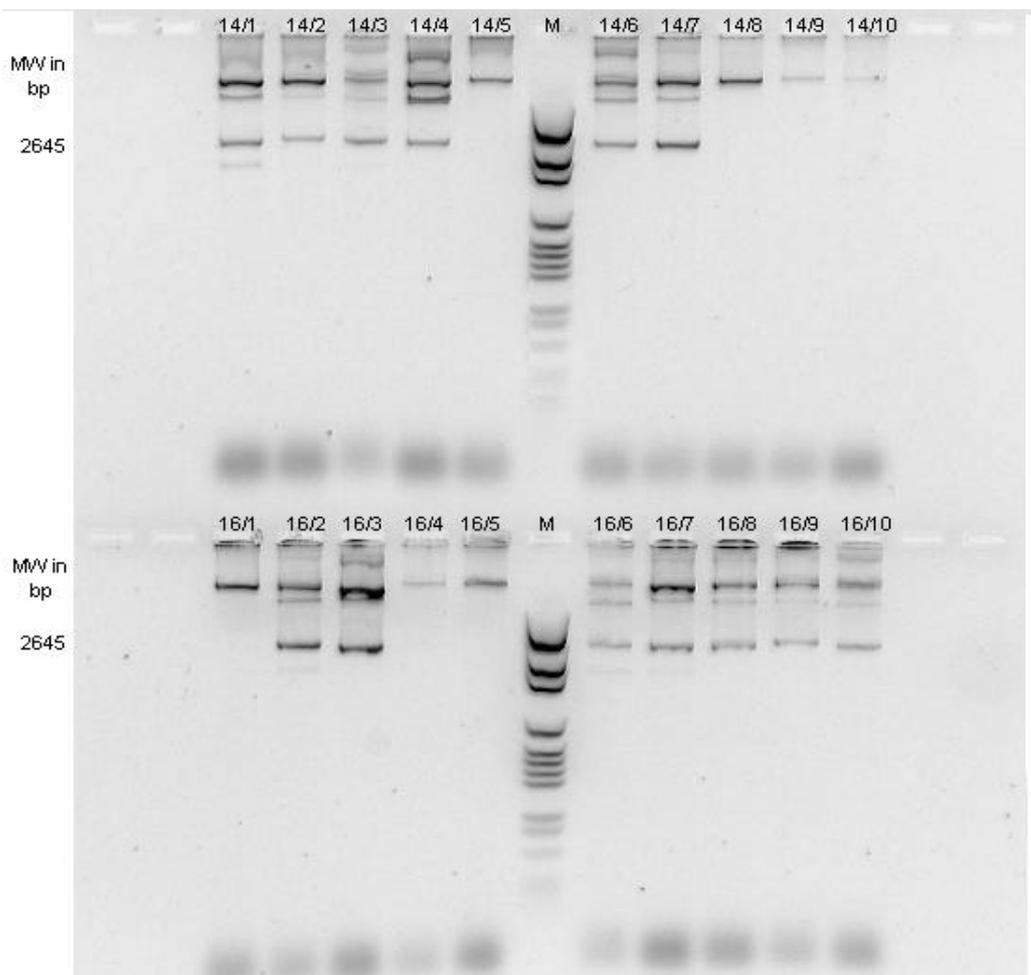
Bei den Proben 14, 22 und 238 ergaben sich nur Identitäten von 90% bis 95% beim Vergleich mit Sequenzen in der NCBI-Datenbank. Um die bis dahin erzielten Resultate abzusichern und eventuell zu verbessern, erfolgte die Klonierung in den *E. coli*-Stamm TG1 unter Verwendung des Plasmids pGEM-T<sup>®</sup>.

Aus den Erfahrungen der Sequenzierung des kleinen Fragmentes, wobei die Ergebnisse nach der Klonierung auch qualitativ verbessert werden konnten, wurden die Amplifikate des großen Fragmentes nicht direkt sequenziert, sondern vorher ebenfalls kloniert. Dabei wurden zusätzlich das Plasmid pDrive und EZ kompetente *E. coli* Zellen verwendet.

#### 4.2.2. Klonierung und wiederholte Sequenzierung der PCR-Fragmente

Die direkte Sequenzierung der kleinen PCR-Produkte war in den meisten Fällen mangelhaft. Daher wurden sowohl die kleinen als auch die großen PCR-Fragmente kloniert. Nach Anfertigen der Minipreps wurde mit Hilfe der Elektrophorese ein Nachweis für das Gelingen der Plasmidisolierung möglich. Dabei sollte die Bande in der Elektrophorese höher als die eigentliche Größe des Plasmids liegen, wenn dieses das Insert trägt. Bei der geringen Größe des eingebauten Fragmentes von 151 bp war dieser Sachverhalt anhand des Gels allerdings nur schwer abschätzbar (Abb. 4.2.2.a). Das 943 bp Insert tragende Plasmid ließ sich hinsichtlich dieser Fragestellung besser beurteilen (Abb. 4.2.2.c).

In der Elektrophorese nach der Plasmidisolat-PCR konnten die Klone mit Plasmid und eingebautem 16S rDNA-Fragment näher differenziert werden. Ein aus der ursprünglichen Ehrlichien-PCR stammendes Amplifikat mit der Größe von 151 bp für das kleine Fragment (Abb. 4.2.2.b) bzw. 943 bp (Abb. 4.2.2.d) für das große Fragment diente zum Vergleich. Lag die Bandenhöhe unter der Vergleichskontrolle, enthielt das Plasmid mit großer Wahrscheinlichkeit kein Insert.

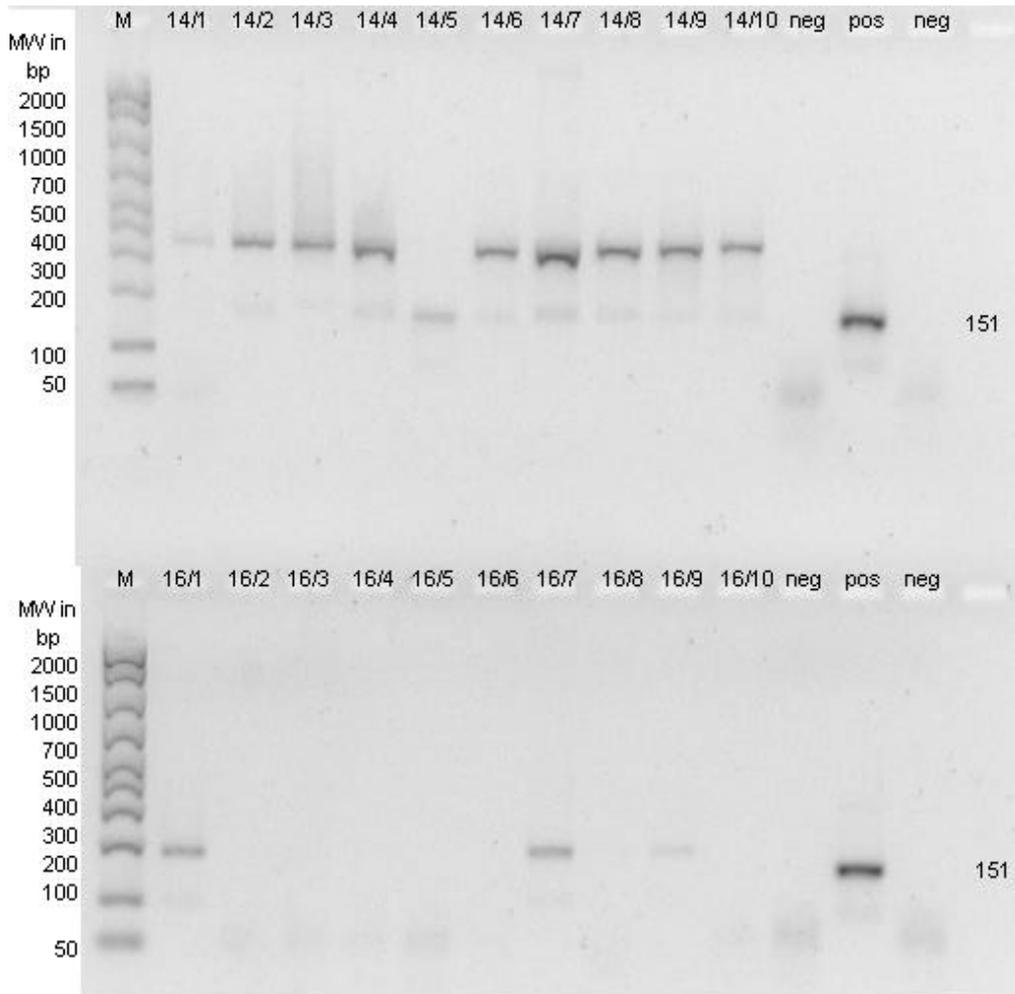


**Abb. 4.2.2.a:** Plasmidisolierung des kleinen PCR-Fragmentes

M bezeichnet den verwendeten pGEM<sup>®</sup>-Marker, welcher Banden in der Höhe von 36 bis 2645 bp anzeigt.

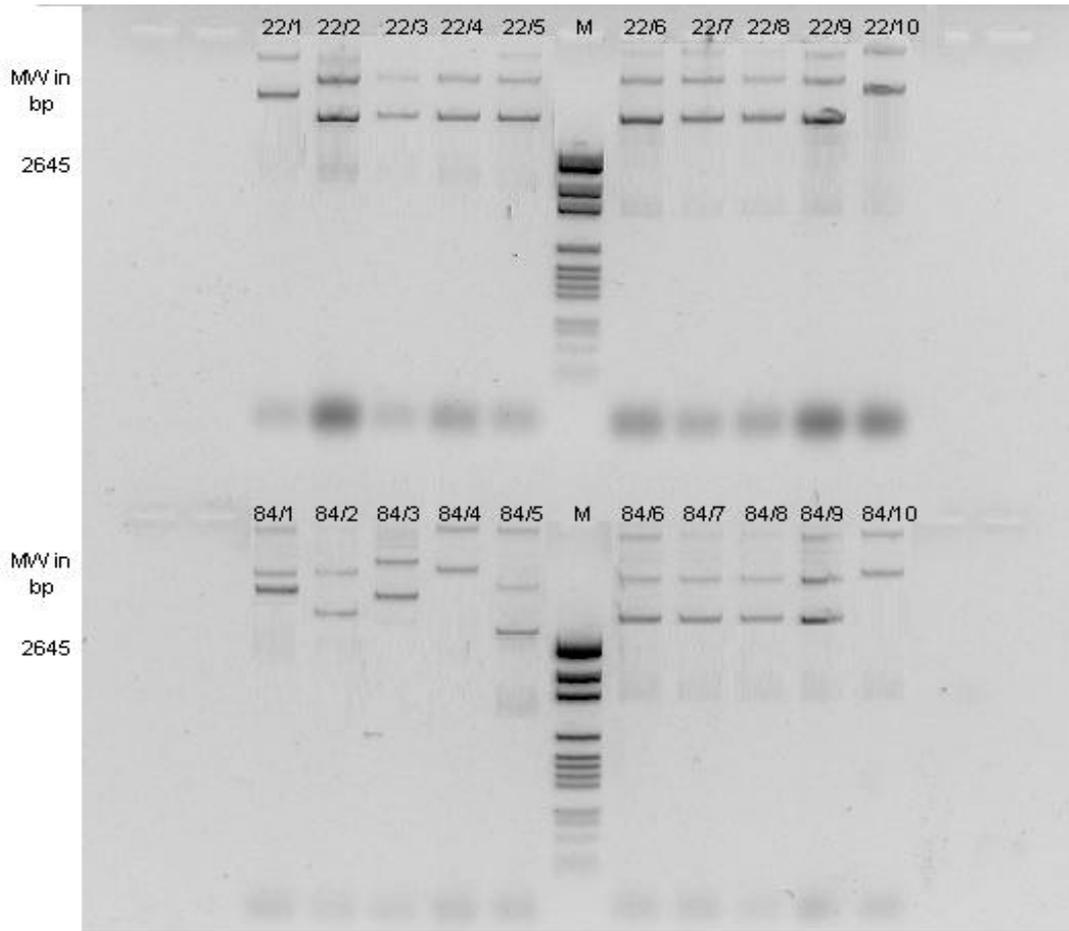
Dargestellt sind jeweils 10 Klone der kurzen PCR-Produkte der Proben 14 (14/1-14/10) und 16 (16/1-16/10).

Zu erkennen ist, daß die Ausgewählten Klone das Plasmid enthalten. Es ist allerdings schwierig, anhand der Bandengrößen zu beurteilen, welche der Plasmide das kleine 151 bp Insert tragen.



**Abb. 4.2.2.b:** Plasmid-PCR des kleinen PCR-Fragmentes

M bezeichnet den verwendeten Marker "Ampli-Size-Molekular-Ruler". Die Plasmide der Klone 14/1 bis 14/4, 14/6 bis 14/10, 16/1, 16/7 und 16/9 enthalten das Plasmid mit eingebautem 151 bp umfassenden Insert. Dagegen ist bei den Klonen 14/5, 16/2 bis 16/6, 16/8 und 16/10 mittels der Plasmid-PCR weder Plasmid-DNA, noch DNA des erwarteten Inserts amplifiziert worden. Die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle für die Sauberkeit der Plasmid-PCR ist negativ und bei der Positivkontrolle der ursprünglichen Ehrlichien-PCR des kleinen Fragmentes ist eine Vergleichsbande in der Höhe von 151 bp zu erkennen.

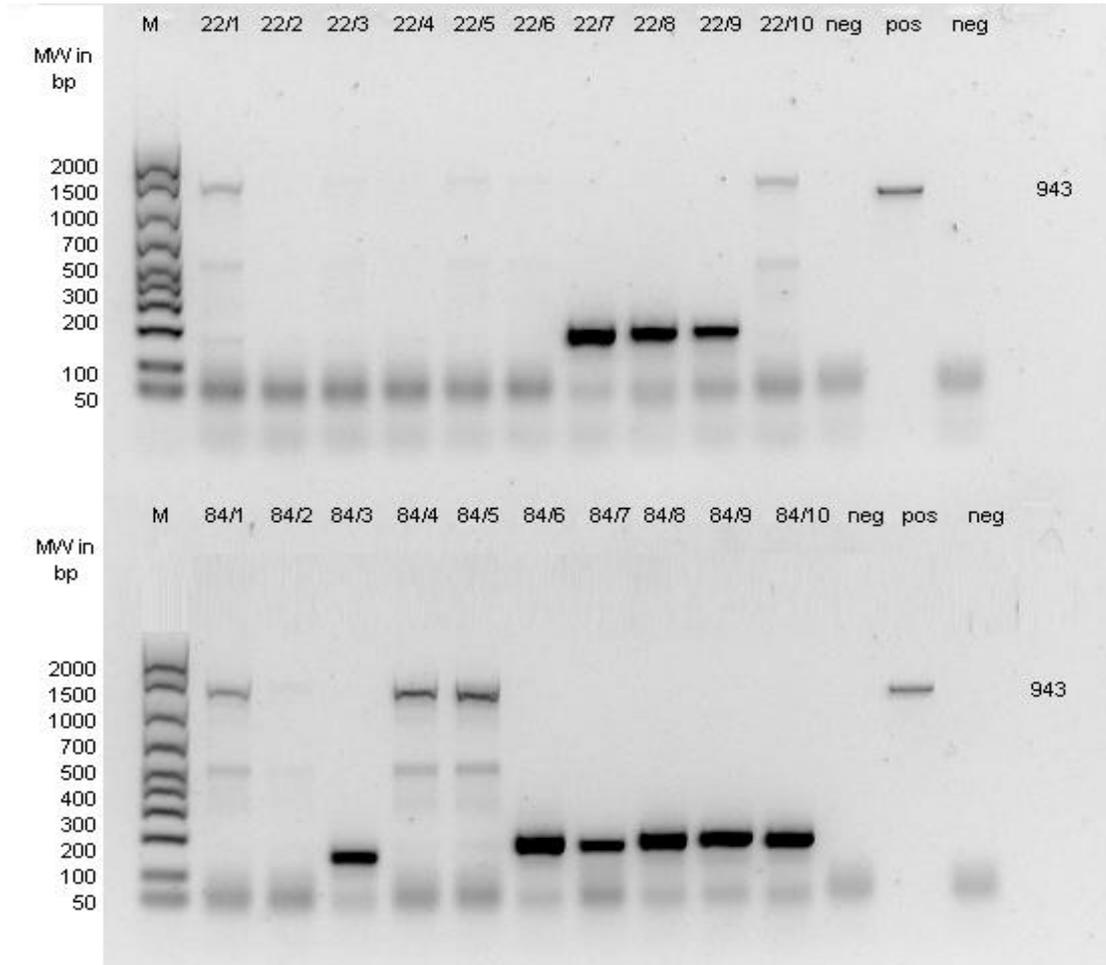


**Abb. 4.2.2.c:** Plasmidisolierung des großen PCR-Fragmentes

M bezeichnet den verwendeten pGEM<sup>®</sup>-Marker, welcher Banden in der Höhe von 36 bis 2645 bp anzeigt.

Dargestellt sind jeweils 10 Klone der großen PCR-Produkte der Proben 22 (22/1-22/10) und 84 (84/1-84/10).

Es läßt sich vermuten, daß die isolierten Plasmide 22/1, 22/10, 84/1, 84/3, 84/4 und 84/10 mit großer Wahrscheinlichkeit das 943 bp Insert tragen.



**Abb. 4.2.2.d:** Plasmid-PCR des großen PCR-Fragmentes

M bezeichnet den verwendeten Marker "Ampli-Size-Molekular-Ruler". Die Plasmide der Klone 22/1, 22/10, 84/1, 84/4 und 84/5 enthalten das Plasmid mit eingebautem 943 bp umfassenden Insert. Dagegen ist bei den Klonen 22/7 bis 22/9, 84/3 und 84/6-84/10 das Plasmid ohne Insert vorhanden. In den Plasmiden der Klone 22/2 bis 22/6 und 84/2 wurde mittels der Plasmid-PCR weder Plasmid-DNA, noch DNA des erwarteten Inserts amplifiziert. Die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle für die Sauberkeit der Plasmid-PCR ist negativ und bei der Positivkontrolle der ursprünglichen Ehrlichien-PCR des großen Fragmentes ist eine Vergleichsbande in der Höhe von 943 bp zu erkennen.

▪ Sequenzierung:

Insgesamt wurde die Klonierung von den 7 positiven Zecken DNA-Amplifikaten der PCR des kleinen und großen Fragmentes vorgenommen. Von der aus München erhaltenen Positivkontrolle wurde nur das kleine Fragment kloniert, um die Verbesserung der Sequenzanalyse nach der Klonierung aufzuzeigen.

Verglichen mit den Daten aus den direkt sequenzierten PCR-Produkten des kleinen Fragmentes (*Abb. 7.1.*, Anhang→Seite 91) sind die aus den Klonen erhaltenen Sequenzen vollständig und über den Gegenstrang verifiziert (*Abb. 7.2.*, Anhang→Seite 92). Für jede der Sequenzen des kleinen Fragmentes ergab sich keine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten Vertreter der *E. phagocytophila* Gruppe. Vielmehr zeigte sich in allen Fällen beim Sequenzvergleich die Übereinstimmung zu gleichem Prozentsatz. Bei den Proben 8 und 16 gelang keine Klonierung des kleinen Fragmentes. Hier lieferten aber bereits die Original PCR-Fragmente eindeutige Sequenzen.

Das große PCR-Fragment wurde kloniert, um dadurch eventuell eine genauere Zuordnung zu einer Spezies der *E. phagocytophila* Gruppe zu erhalten (Ergebnisse→Seite 68).

Nach der Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte der positiven Proben wurden die Sequenzen an den Überlagerungsstellen zusammengefügt, wobei sich Sequenzlängen von bis zu 1074 bp ergaben. Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Klonierung des kleinen Fragmentes der Proben 8 und 16 sind diese beiden Sequenzen etwas kürzer.

Die Resultate der Sequenzierungen der klonierten kleinen und großen PCR-Fragmente sind in Form der zusammengesetzten Sequenzen im Anhang dargestellt (*Abb. 7.2.*, Anhang→Seite 92). Die Überlappungsstelle ist dabei jeweils markiert.

### 4.3. Borrelienuntersuchungen

#### 4.3.1. Ergebnisse der Borrelien-PCR

Mit den Primern OspA-V1a, OspA-V1b, R1 in der Primärampifizierung und OspA-V2a, OspA-V2b, R1 in der "semi-nested" PCR, sollten die 4 Spezies *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. b.* sensu stricto und *B. valaisiana* des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes erfaßt werden.

Aus jeder Spezies wurde ein Vergleichsstamm verwendet:

- *Borrelia afzelii* PKo, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: S48322
- *Borrelia garinii* PBi, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: X80257
- *Borrelia burgdorferi* sensu stricto PKa, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: X80182
- *Borrelia valaisiana* VS116, verwendete Sequenz der NCBI-Datenbank→Accession No: AB016979

Die Stämme besaßen in den Primerbereichen geringfügige Unterschiede, die auch in der Auswahl der Primer berücksichtigt wurden (*Tab. 3.3.1.*→Seite 34, *Abb.4.3.1.a*).

	5'					50
	1					
afzPKo	TATACTATAA	TTATACTTGT	ATTAAGTTAT	ATTAATATAA	TATAAAAAGG	
garPBi	.....	.....	.....	.....	.....	
ssPKa	.....	.....	.....	.....	.....	
val	.....	.....	.....	..TAATATAA	TATAAAA.GG	
	51					100 →
afzPKo	AGAATATATT	ATGAAAAAAT	ATTTATTGGG	<u>AATAGGTCTA</u>	<u>ATATTAGCCT</u>	V1a
garPBi	.....	ATGAAAAAAT	ATTTATTGGG	<u>AATAGGTCTA</u>	<u>ATATTAGCCT</u>	V1a
ssPKa	.....	ATGAAAAAAT	ATTTATTGGG	<u>AATAGGTTTA</u>	<u>ATATTAGCCT</u>	V1a
val	AGAATATATT	ATGAAAAAAT	ATTTATTGGG	<u>AATAGGTCTA</u>	<u>ATATTAGCCT</u>	V1a
	101					150
afzPKo	TAATAGCATG	CAAGCAAAAT	GTTAGCAGCC	TTGATGAAAA	<u>AAACAGCGCT</u>	
garPBi	TAATAGCATG	TAAGCAAAAT	GTTAGCAGCC	TTGATGAGAA	<u>AAACAGCGTT</u>	
ssPKa	TAATAGCATG	TAAGCAAAAT	GTTAGCAGCC	TTGACGAGAA	<u>AAACAGCGTT</u>	
val	TAATAGCATG	TAAGCAAAAT	GTTAGCAGCC	TTGATGAAAA	<u>AAACAGCGCT</u>	
	151					200 →
afzPKo	<u>TCAGTAGATT</u>	<u>TGCCTGGTGA</u>	GATGAAAGTT	CTTGTAAGTA	AAGAAAAAGA	V2a
garPBi	<u>TCAGTAGATT</u>	<u>TACCTGGTGA</u>	AATGAAAGTT	CTTGTAAGCA	AAGAAAAAGA	V2b
ssPKa	<u>TCAGTAGATT</u>	<u>TGCCTGGTGA</u>	AATGAAAGTT	CTTGTAAGCA	AAGAAAAAGA	V2a
val	<u>TCAGTAGATT</u>	<u>TACCCGGCGA</u>	AATGAAAGTT	CTTGTAAGCA	AAGAAAAAGA	V2b
	201					250
afzPKo	CAAAGACGGT	AAGTACAGTC	TAAAGGCAAC	AGTAGACAAG	ATTGAGCTAA	
garPBi	CAAAGATGGT	AAATACAGTC	TAATGGCAAC	AGTAGACAAG	CTAGAGCTTA	
ssPKa	CAAAGACGGC	AAGTACGATC	TAATTGCAAC	AGTAGACAAG	CTTGAGCTTA	
val	CAAAGACGGT	AAATACAGTC	TAGTGGCAAC	AGTAGACAAA	GTTGAGCTTA	

	251				300
afzPKo	AAGGAACTTC	TGATAAAGAC	AATGGTTCTG	GGGTGCTTGA	AGGTACAAAA
garPBi	AAGGAACTTC	TGATAAAAAGC	AACGGTTCTG	GAACACTTGA	AGGTGAAAAA
ssPKa	AAGGAACTTC	TGATAAAAAAC	AATGGATCTG	GAGTACTTGA	AGGCGTAAAA
val	AAGGAACTTC	TGATAAAAAAC	AATGGTTCTG	GAACACTTGA	AGGCGTAAAA
	301				350
afzPKo	GATGACAAAA	GTAAAGCAAA	ATTAACAATT	GCTGACGATC	TAAGTAAAAAC
garPBi	TCTGACAAAA	GTAAAGCAAA	ATTAACAATT	TCTGAAGATC	TAAGTAAAAAC
ssPKa	GCTGACAAAA	GTAAAGTAAA	ATTAACAATT	TCTGACGATC	TAGGTCAAAC
val	GATGACAAAA	GTAAAGTAAA	ATTAACAATT	TCTGATGATC	TAGGCGAAAC
	351				400
afzPKo	CACATTCGAA	CTTTTCAAAG	AAGATGGCAA	AACATTAGTG	TCAAGAAAAAG
garPBi	CACATTTGAA	ATTTTCAAAG	AAGATGGCAA	AACATTAGTA	TCAAAAAAAG
ssPKa	CACACTTGAA	GTTTTCAAAG	AAGATGGCAA	AACACTAGTA	TCAAAAAAAG
val	CAAACCTGAA	ACTTTCAAAG	AAGATGG...	AACATTAGTG	TCAAGAAAAAG
	401				450
afzPKo	TAAGTTCTAA	AGACAAAACA	TCAACAGATG	AAATGTTCAA	TGAAAAAGGT
garPBi	TAAATTCTAA	AGATAAGTCA	TCAATAGAAG	AAAAATTCAA	CGCAAAAGGT
ssPKa	TAACTTCCAA	AGACAAGTCA	TCAACAGAAG	AAAAATTCAA	TGAAAAAGGT
val	TAAATTTCAA	AGACAAGTCT	TTCACAGAAG	AAAAATTCAA	TGAAAAAGGT
	451				500
afzPKo	GAATTGTCTG	CAAAAACCAT	GACAAGAGAA	AATGGAACCA	AACTTGAATA
garPBi	GAATTATCTG	AAAAAACAAT	ACTAAGAGCA	AACGGAACCA	GGCTTGAATA
ssPKa	GAAGTATCTG	AAAAAATAAT	AACAAGAGCA	GACGGAACCA	GACTTGAATA
val	GAAGTGTCTG	AAAAAATACT	AACAAGATCA	AACGGAACCA	CACTTGAATA
	501				550
afzPKo	TACAGAAATG	AAAAGCGATG	GAA...CCGG	AAAAGCTAAA	GAAGTTTTAA
garPBi	CACAGAAATA	AAAAGCGATG	GAA...CCGG	AAAAGCTAAA	GAAGTTTTAA
ssPKa	CACAGGAATT	AAAAGCGATG	GAT...CTGG	AAAAGCTAAA	GAGGTTTTAA
val	CTCACAAATG	ACAGATGCTG	AAAATGCTAC	AAAAGCAGTA	GAAACTCTAA
	551				600
afzPKo	AA...AACTT	TACTCTTGAA	GGAAAAGTAG	CTAATGATAA	AGTAACATTG
garPBi	AA...GACTT	TGCTCTTGAA	GGAACTCTAG	CTGCCGACAA	AACAACATTG
ssPKa	AA...GGCTA	TGTTCTTGAA	GGAACTCTAA	CTGCTGAAAA	AACAACATTG
val	AAAATGGCAT	TAAGCTTCCA	GGAAATCTTG	TAGGCGGAAA	AACAACATTG
	601				650
afzPKo	GAAGTAAAAG	AAGGAACCGT	TACTTTAAGT	AAGGAAAATTG	CAAAATCTGG
garPBi	AAAGTTACAG	AAGGCACTGT	TGTTTTAAGC	AAACACATTG	CAAACTCTGG
ssPKa	GTGGTTAAAG	AAGGAACTGT	TACTTTAAGC	AAAAATATTT	CAAAATCTGG
val	AAAATCACAG	AAGGTACTGT	TACTTTAAGC	AAGCACATTG	CAAAATCTGG
	651				700
afzPKo	AGAAGTAACA	GTTGCTCTTA	ATGACACTAA	CACTACTCAG	GCTACTAAAA
garPBi	AGAAATAACA	GTTGAGCTTA	ATGACTCTAA	CTCTACTCAG	GCTACTAAAA
ssPKa	GGAAGTTTCA	GTTGAACTTA	ATGACACTGA	CAGTAGTGCT	GCTACTAAAA
val	AGAAGTAACA	GTTGAAATTA	ACGACACTTC	AAGCACTCCA	AATACTAAAA
	701				750
afzPKo	AAACTGGCGC	ATGGGATTCA	AAAACCTTCTA	CTTTAACAAT	TAGTGTTAAC
garPBi	AAACTGGAAA	ATGGGATTCA	AATACTTCCA	CTTTAACAAT	TAGTGTGAAT
ssPKa	AAACTGCAGC	TTGGAATTCA	GGCACTTCAA	CTTTAACAAT	TACTGTAAAC
val	AAACTGGAAA	ATGGGATGCA	AGAAATTCAA	CTTTAACAAT	TATTGTTGAC

```

751                                     800
afzPKo  AGCAAAAAA  CTACACAAC  TGTGTTTACT  AAACAAGACA  CAATAACTGT
garPBi  AGCAAAAAA  CTAAAAACAT  TGTATTTACA  AAA.GAGACA  CAATAACAGT
ssPKa   AGTAAAAAA  CTAAAGACCT  TGTGTTTACA  AAAGAAAAA  CAATTACAGT
val     AGCAAAAAA  AGACAAAAC  TGTATTTACA  AAACAAGACA  CAATAACAGT

801                                     850
afzPKo  ACAAAAATAC  GACTCCGCAG  GTACCAATTT  AGAAGGCACA  GCAGTCGAAA
garPBi  ACAAAAATAC  GACTCAGCAG  GCACCAATCT  AGAAGGCAAC  GCAGTCGAAA
ssPKa   ACAACAATAC  GACTCAAATG  GCACCAAATT  AGAGGGGTCA  GCAGTTGAAA
val     ACAAAGCTAT  AACCTGCAG  GCAACAAGCT  AGAAGGTACA  GCAGTTGAAA

851                                     900←
afzPKo  TTAAACACT  TGATGAACTT  AAAAAACGCTT  TGAATAA... .. R1*
garPBi  TTAAACACT  TGATGAACTT  AAAAAACGCTT  TAAATAA... .. R1*
ssPKa   TTACAAACT  TGATGAAATT  AAAAAACGCTT  TAAATAA... .. R1*
val     TTAAACACT  TCAAGAACTT  AAAAAACGCTT  TAAATAAAGG  AGAATTTATG  R1*

901                                     921
afzPKo  .....
garPBi  .....
ssPKa   .....
val     AAACAATATT  TACTAGGATT  T
3'

```

\* Primer sind komplementär dargestellt.

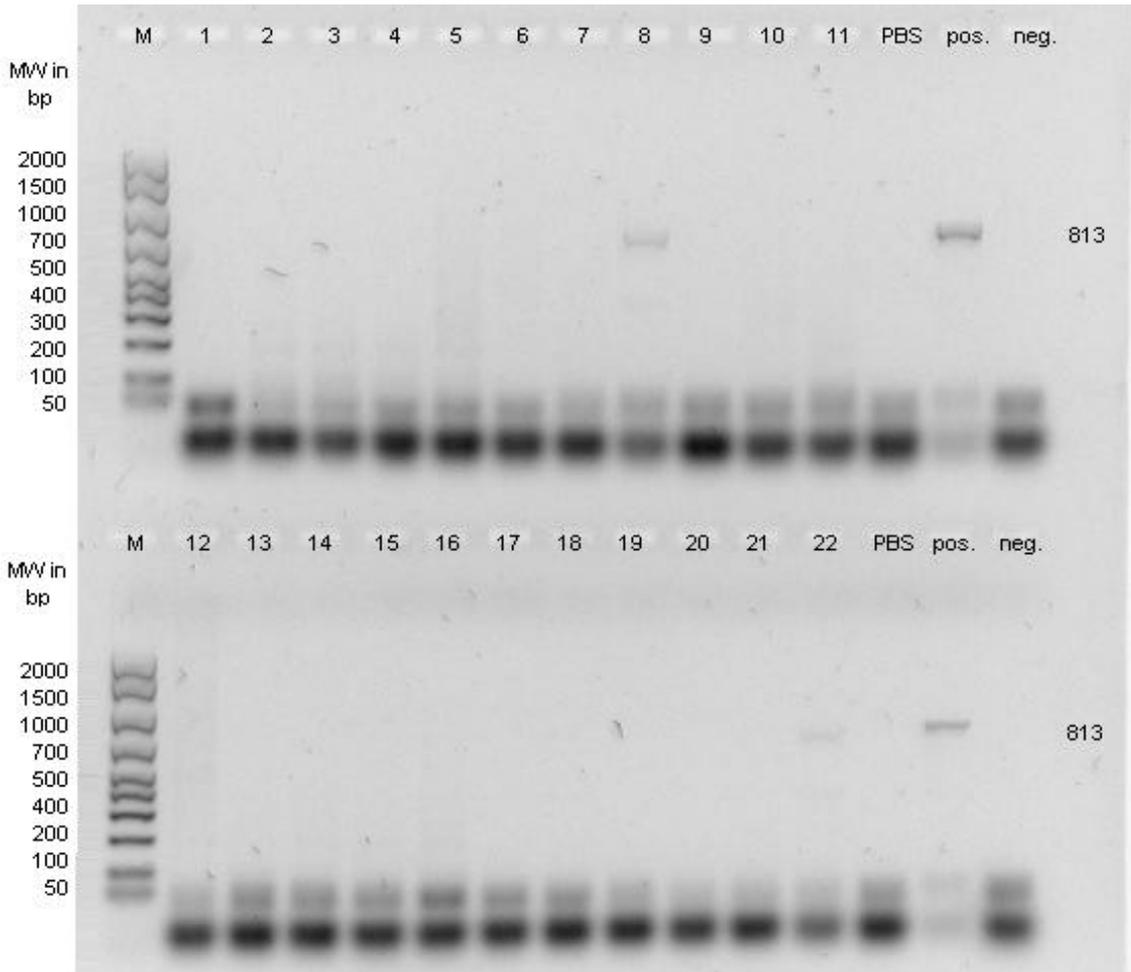
**Abb. 4.3.1.a:** Alignment des OspA Gens der 4 Vergleichsstämme

Unter der Internetadresse: "<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>" wurde ein Alignment des OspA Gens der 4 verwendeten Vergleichsstämme angefertigt.

Die verwendeten Abkürzungen afzPKo, garPBi, ssPKa und val bezeichnen die Spezies *Borrelia afzelii* (PKo), *Borrelia garinii* (PBi), *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (PKa) und *Borrelia valaisiana*. Die Primer sind jeweils in ihrer DNA-Syntheserichtung 5' zu 3' (→) oder 3' zu 5' (←) eingezeichnet. In den Primerbereichen sind die Basenunterschiede zwischen den einzelnen Spezies markiert. Anhand der Sequenz von *B. valaisiana* wird auch die Lage des Primers R1 im intergenischen Bereich erkennbar.

Meist war nach der Primäramplifizierung der Borrelien-PCR noch keine eindeutig positive Bande im Gel erkennbar. Die erwartete Größe des PCR-Produktes betrug bei positiven 813 bp (Abb. 4.3.1.b).

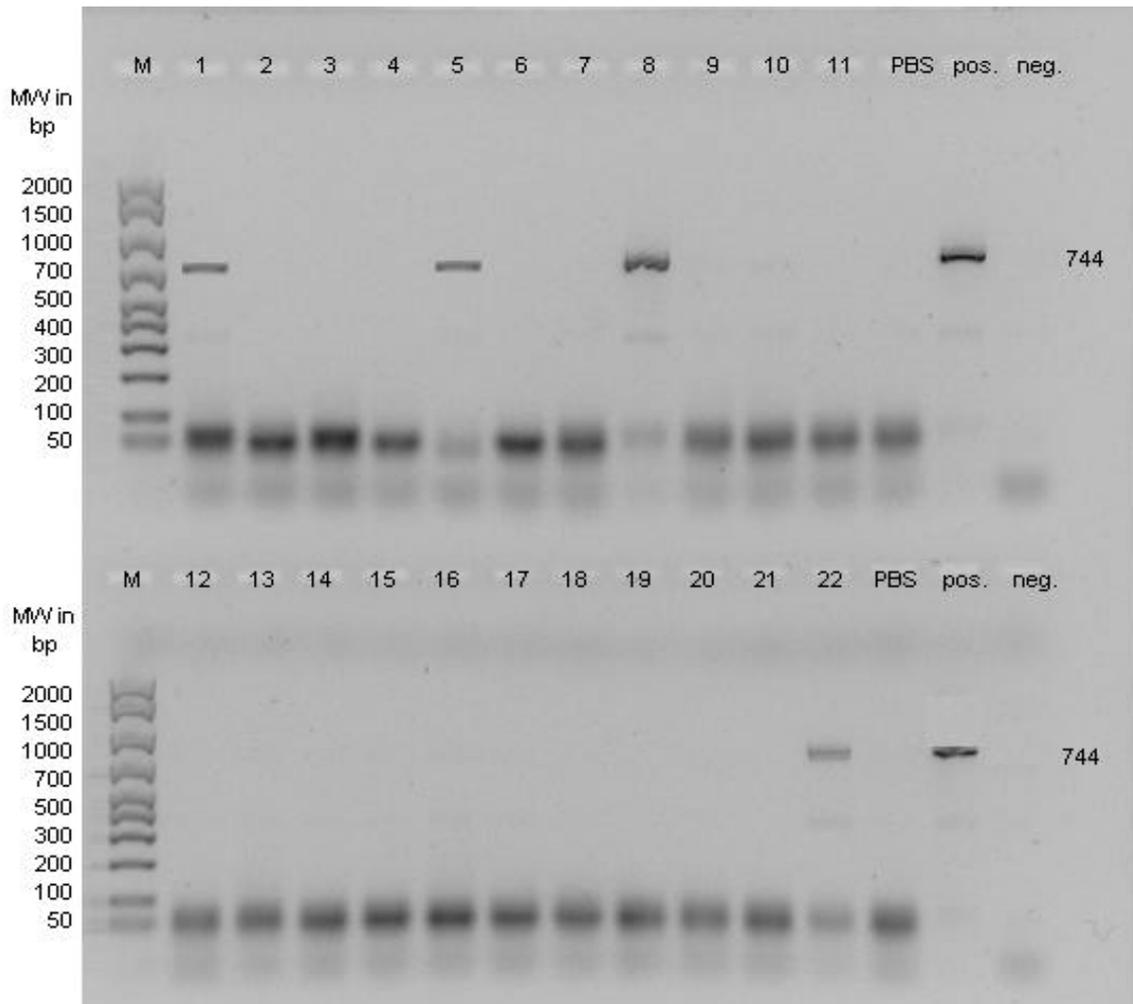
Durch die "semi-nested" PCR erhöhte sich die Empfindlichkeit. In einzelnen Proben, die im ersten Durchlauf noch als negativ erschienen, zeigte sich in der "semi-nested" PCR die Anwesenheit von Borrelien-DNA. Die Borrelien-positiven PCR-Fragmente besaßen eine Größe von 744 bp (Abb. 4.3.1.c).



**Abb. 4.3.1.b:** Primäramplifizierung

M bezeichnet den verwendeten Marker (Ampli-Size-Molekular-Ruler) mit Banden in der Höhe von 50 bis 2000 bp.

Die Proben 1-7, und 9-21 sind negativ, während die Proben 8 und 22 bereits eine schwach positive Bande nach der 1. PCR im Gel zeigen. Diese liegt auch in der erwarteten Höhe von etwa 813 bp. Sowohl die Negativ-PBS-Kontrolle als auch die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle sind negativ. Eine positive Vergleichsbande der Spezies *B. garinii* ist in der Höhe von 813 bp erkennbar.



**Abb. 4.3.1.c:** "semi-nested" PCR

M bezeichnet den verwendeten Marker (Ampli-Size-Molekular-Ruler) mit Banden in der Höhe von 50 bis 2000 bp.

Die Proben 2-4, 6, 7, 9-11, und 12-21 sind negativ. Zusätzlich zu den bereits nach der 1. PCR positiven Proben 8 und 22 sind in der 2. PCR auch die Proben 1 und 5 positiv. Die zu erkennenden Banden der vier Proben 1, 5, 8 und 22 liegen auch in der erwarteten Höhe von etwa 744 bp. Sowohl die Negativ-PBS-Kontrolle als auch die Negativ-Aqua dest.-Kontrolle sind negativ. Eine positive Vergleichsbande der Spezies *B. garinii* ist in der Höhe von 744 bp erkennbar.

#### 4.3.2. Speziesdifferenzierung der Borrelien-DNA

Das Schneiden der Amplifikate der "semi-nested" PCR mit den 5 Enzymen Kpn 21, Bgl II, Sfu I, Ssp I und AlwN I ermöglichte die Differenzierung der Spezies: *B. afzelii*, *B. garinii* (SG4, SG5, SG6), *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. valaisiana* in den untersuchten Gebieten. Mit Sfu I wird *B. afzelii* (Abb. 4.3.2.a) charakterisiert. Mit Hilfe des Enzyms Ssp I wird *B. b.* sensu stricto identifiziert (Abb. 4.3.2.b) und AlwN I schneidet spezifisch *B. valaisiana* (Abb. 4.3.2.b). Die verschiedenen Serotypen von *B. garinii* (SG3, SG4, SG5, SG6) werden durch die Enzyme Kpn 21 und Bgl II erfaßt. Kpn 21 besitzt charakteristische Schnittstellen in *B. garinii* SG3, SG5 und SG6 (Tab. 3.3.3.a→Seite 37, Abb. 4.3.2.c, Abb. 4.3.2.d), Bgl II schneidet spezifisch die Serotypen *B. garinii* SG3 und SG4 (Tab. 3.3.3.a→Seite 37, Abb. 4.3.2.c).

Im untersuchten Gebiet traten die Serotypen *B. garinii* SG4, SG5 und SG6 in unterschiedlicher Häufigkeit auf, wobei SG6 am häufigsten vertreten war. Während bei den Positivkontrollen die Bandenmuster recht eindeutig waren, ließen sich *B. garinii* SG5 und SG6 in den infizierten Zecken oft nur schwer voneinander abgrenzen. Aus diesem Grund wurden die detektierten OspA-Typen bei der Auswertung alle zu *B. garinii* zusammengefaßt und nicht einzeln aufgegliedert.

In 4 Fällen war eine Koinfektion mit *B. garinii* / *B. b.* sensu stricto nachweisbar (Abb. 4.3.2.e).

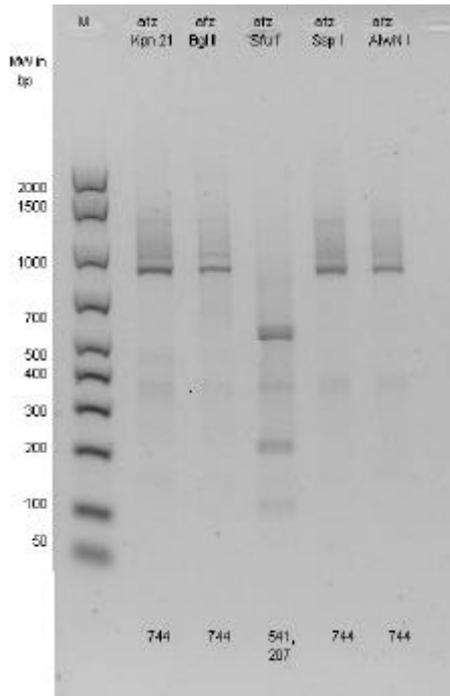


Abb. 4.3.2.a:

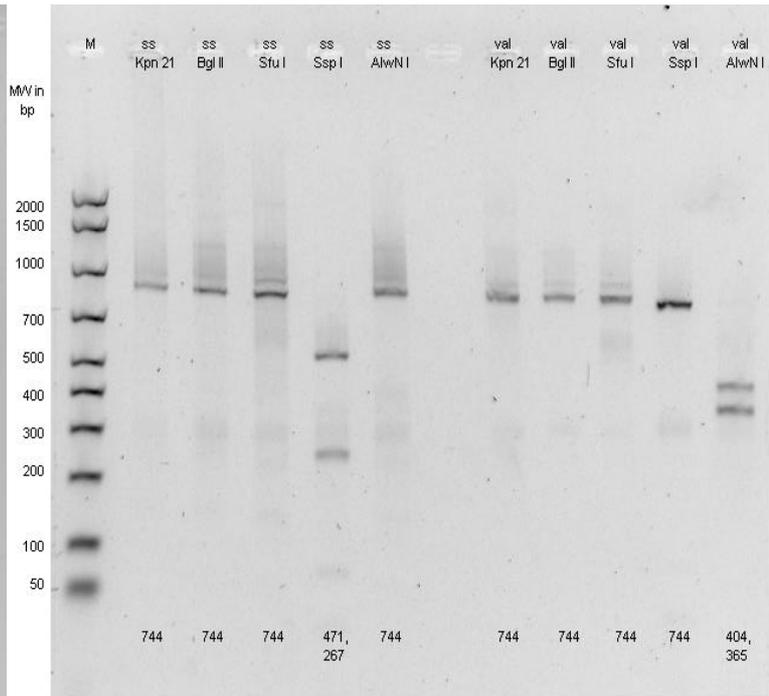


Abb. 4.3.2.b

**Abb. 4.3.2.a:** Restriktionsverdau *Borrelia afzelii*

M bezeichnet den Marker (Ampli-Size-Molekular-Ruler). Mit den Enzymen Kpn 21, Bgl II, Ssp I und AlwN I wird *B. afzelii* nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Sfu I schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 207 bp und 541 bp entstehen.

**Abb. 4.3.2.b:** Restriktionsverdau *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *Borrelia valaisiana*

Mit den Enzymen Kpn 21, Bgl II, Sfu I und AlwN I wird *B. burgdorferi* sensu stricto nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Ssp I schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 267 bp und 471 bp entstehen.

Mit den Enzymen Kpn 21, Bgl II, Sfu I und Ssp I wird *B. valaisiana* nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Kpn 21 schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 365 bp und 404 bp entstehen.

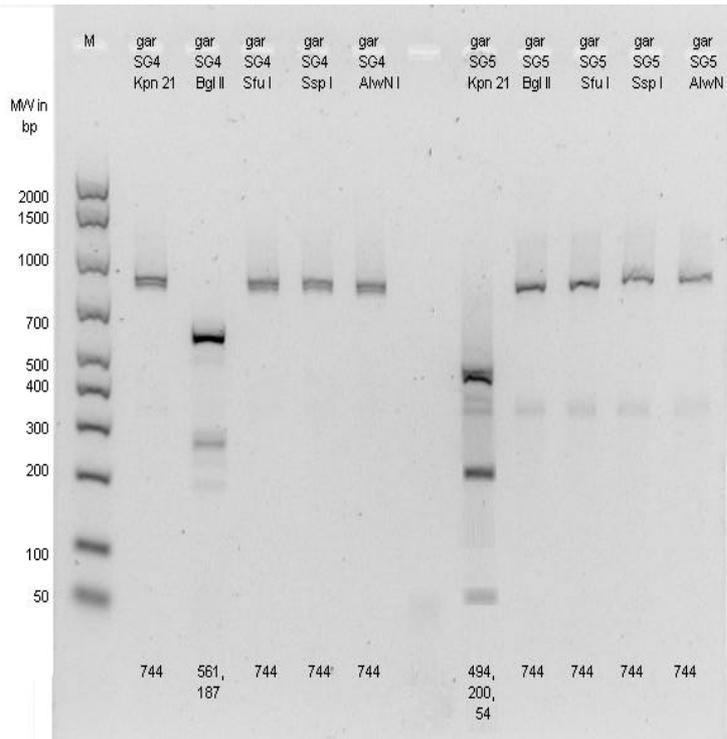


Abb. 4.3.2.c

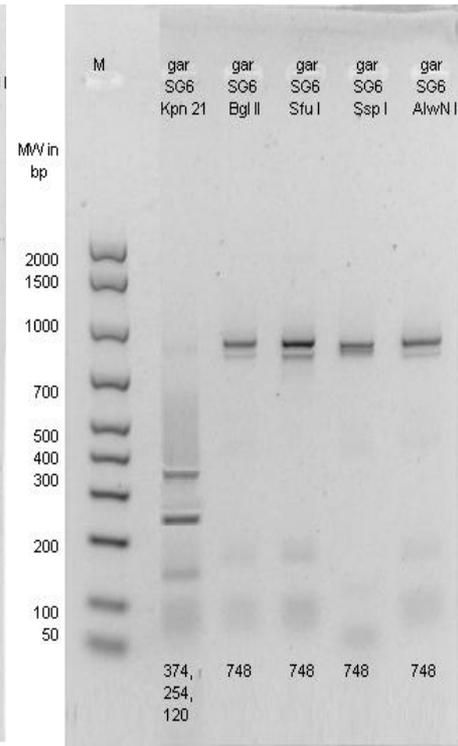


Abb. 4.3.2.d

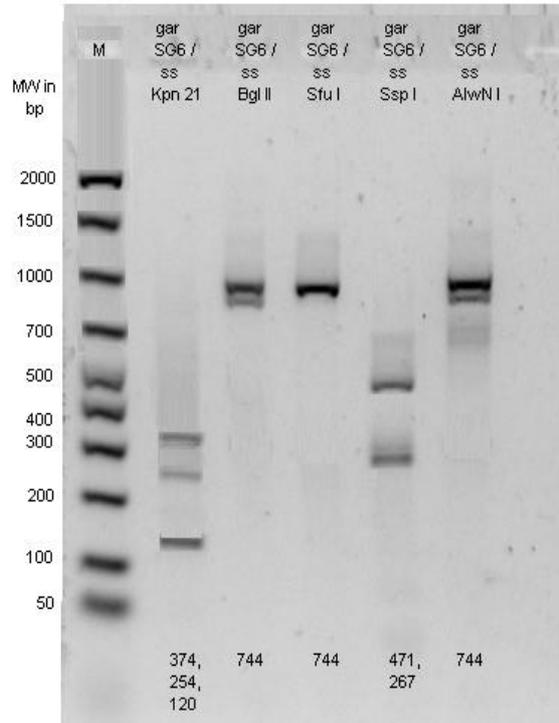
**Abb. 4.3.2.c:** Restriktionsverdau *Borrelia garinii* SG4 und *Borrelia garinii* SG5

Mit den Enzymen Kpn 21, Sfu I, Ssp I und AlwN I wird *B. garinii* SG4 nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Bgl II schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 187 bp und 561 bp entstehen.

Mit den Enzymen Bgl II, Sfu I, Ssp I und AlwN I wird *B. garinii* SG5 nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Kpn 21 schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 54 bp, 200 bp und 494 bp entstehen.

**Abb. 4.3.2.d:** Restriktionsverdau *Borrelia garinii* SG6

Mit den Enzymen Bgl II, Sfu I, Ssp6 und AlwN I wird *B. garinii* SG6 nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Kpn 21 schneidet spezifisch diesen Serotyp, so daß Banden in Höhe von 120 bp, 254 bp und 374 bp entstehen.



**Abb. 4.3.2.e:** Restriktionsverdau der Koinfektion *Borrelia garinii* SG6 / *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

Mit den Enzymen Bgl II, Sfu I, Ssp6 und AlwN I wird *B. garinii* SG6 nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Kpn 21 schneidet spezifisch diesen Serotyp, so daß Banden in Höhe von 120 bp, 254 bp und 374 bp entstehen.

Mit den Enzymen Kpn 21, Bgl II, Sfu I und AlwN I wird *B. burgdorferi* sensu stricto nicht geschnitten, so daß sich eine Gelbande in der Höhe von 744 bp ergibt. Das Enzym Ssp I schneidet spezifisch diese Spezies, so daß Banden in Höhe von 267 bp und 471 bp entstehen.

Da sowohl mit dem Enzym Kpn 21 als auch mit Ssp I für die jeweiligen Spezies charakteristische Fragmentgrößen entstanden, liegt eine Koinfektion mit *B. garinii* SG6 / *B. b.* sensu stricto vor.

## **4.4. Prävalenzen**

### **4.4.1. Ehrlichien: Verteilung, Entwicklungsstadium, saisonale Abhängigkeit, Sequenzanalyse**

#### ▪ *Verteilung:*

Die Gesamtinfektionsrate für Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Genogruppe betrug 2,3% (7 von 305, *Abb. 4.4.a*). In den drei Gebieten war die Prävalenz unterschiedlich verteilt (*Abb. 4.4.b*):

⇒ Bad Berka: 0% Männchen (0 von 13), 5,6% Weibchen (1 von 18), 2,6% Nymphen (3 von 114), Total 2,8% (4 von 145)

⇒ Belvedere: 14,3% Männchen (1 von 7), 28,6% Weibchen (2 von 7), 0% Nymphen (0 von 66), Total 3,8% (3 von 80)

⇒ Dienstedt: 0% Männchen (0 von 8), 0% Weibchen (0 von 9), 0% Nymphen (0 von 63), Total 0% (0 von 80)

Die Verteilung der Ehrlichien scheint regional sehr unterschiedlich zu sein. So traten Infektionsraten von 0% bis 14,3% bei den Männchen, 0% bis 28,6% bei den Weibchen und 0% bis 2,6% bei den Nymphen auf. Auffällig ist, daß alle infizierten Männchen aus Belvedere und alle infizierten Nymphen aus Bad Berka stammten. Es läßt sich vermuten, daß das Vorkommen der Ehrlichien fokal begrenzt ist, da in Dienstedt keine der 80 dort gefangenen Zecken mit dem Erreger infiziert war.

#### Entwicklungsstadium:

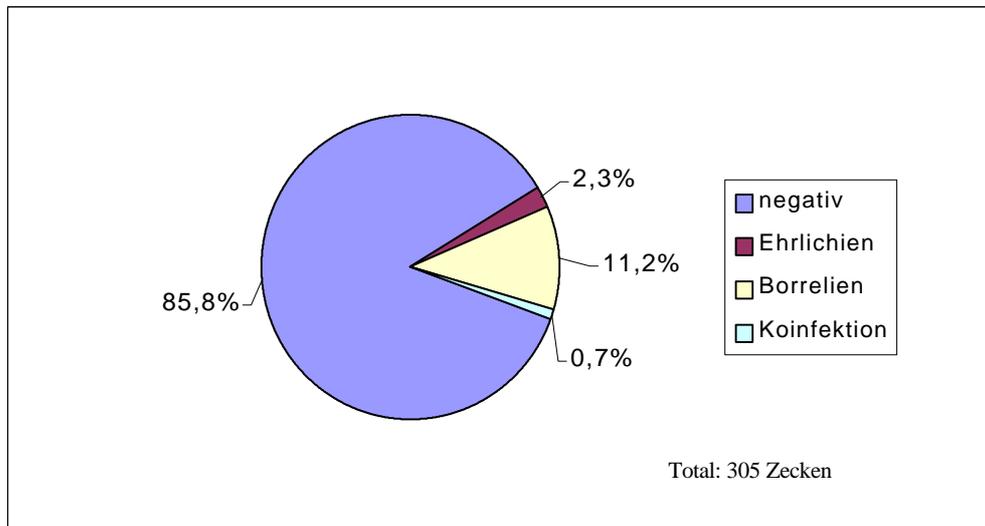
Von insgesamt 2,3% (7 von 305) mit Ehrlichien infizierten Zecken betraf dies im einzelnen 3,6% der Männchen (1 von 28), 8,8% der Weibchen (3 von 34) und 1,2% der Nymphen (3 von 243, *Abb. 4.4.c*→Seite 67).

Prozentual waren mehr Adulte (6,5%) als Nymphen (1,2%) befallen.

#### ▪ *Saisonale Abhängigkeit:*

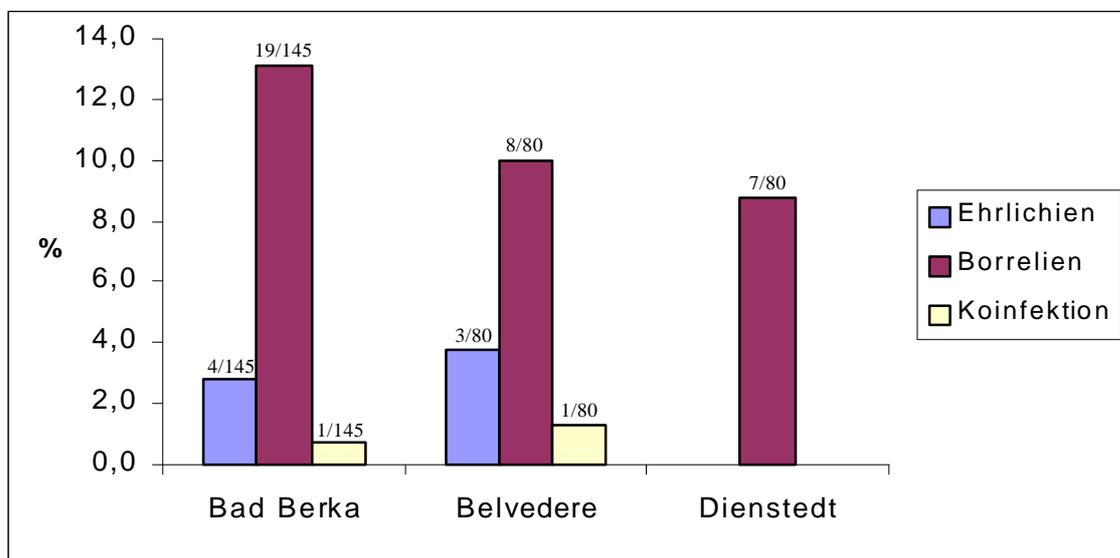
Von den 7 positiven Tieren wurden 1 im Mai, 2 im Juli und 4 im September gefangen (*Tab. 4.4.a*). Die Prävalenz nahm im Laufe des Jahres vom Frühjahr (Mai / Juni) über den Sommer (Juli / August) und Herbst (September / Oktober) zu (*Abb. 4.4.d*→Seite 67), wobei für eine

allgemein gültige Aussage aufgrund der insgesamt relativ niedrigen Infektionsrate eine größere Anzahl von untersuchten Zecken zur Bestätigung erforderlich ist.

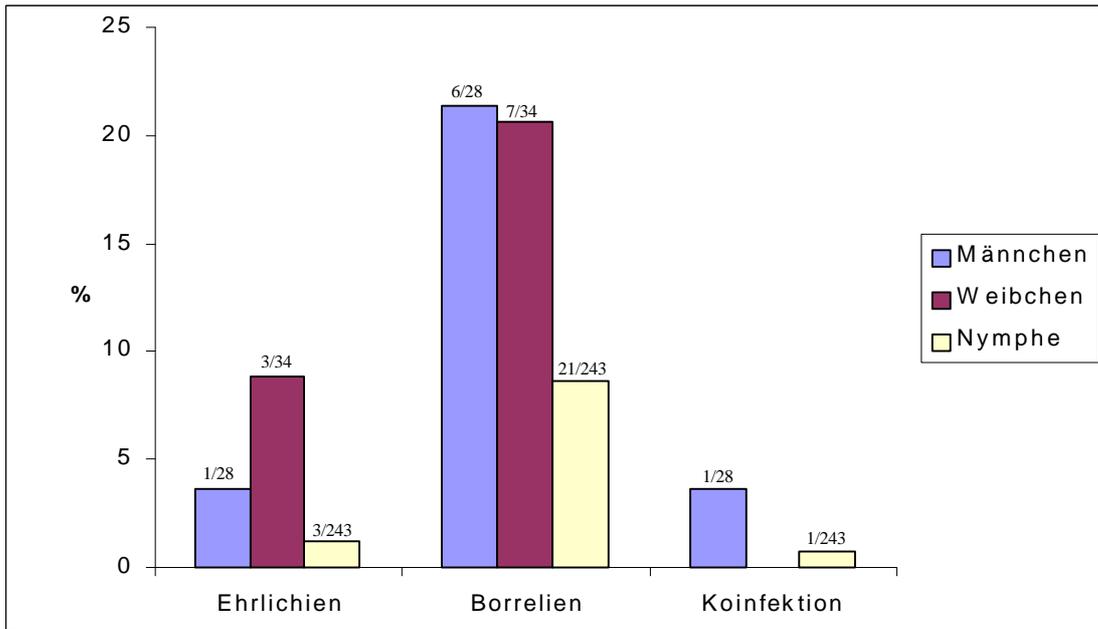


**Abb. 4.4.a:** Koinfektionsrate

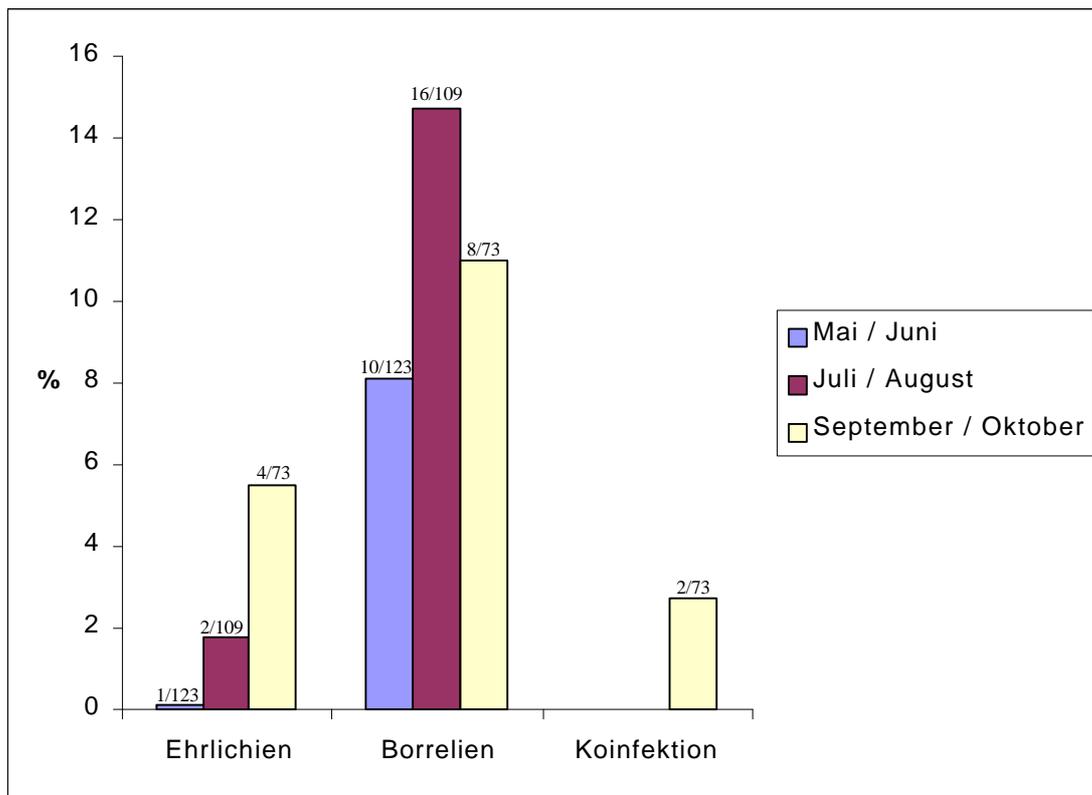
Diese Abbildung zeigt sowohl die Infektionsraten der untersuchten *Ixodes ricinus* Zecken mit DNA für Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe und Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes, als auch den Anteil von Koinfektionen mit Ehrlichien- und Borrelien-DNA.



**Abb. 4.4.b:** Vergleich der Infektionsraten in den Habitaten



**Abb. 4.4.c:** Prävalenz von Ehrlichien, Borrelien und die Koinfektionsrate in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium



**Abb. 4.4.d:** Saisonale Entwicklung der Infektionsraten

Die Zecken wurden in den Monaten Mai bis Oktober gesammelt. Zur Veranschaulichung der saisonalen Entwicklung der Infektionsraten wurden die Monate Mai / Juni (Frühjahr), Juli / August (Sommer) und September / Oktober (Herbst) zusammengefasst.

<u>Monat</u>	<u>Anzahl</u>	<u>Ehrlichien</u> <u>positiv</u>	<u>Borrelien</u> <u>positiv</u>	<u>Koinfektion</u> <u>positiv</u>
Mai	25	1	1	0
Juni	98	0	9	0
Juli	76	2	12	0
August	33	0	4	0
September	41	4	4	2
Oktober	32	0	4	0
total (%)	305	7 (2,3)	34 (11,2)	2 (0,7)

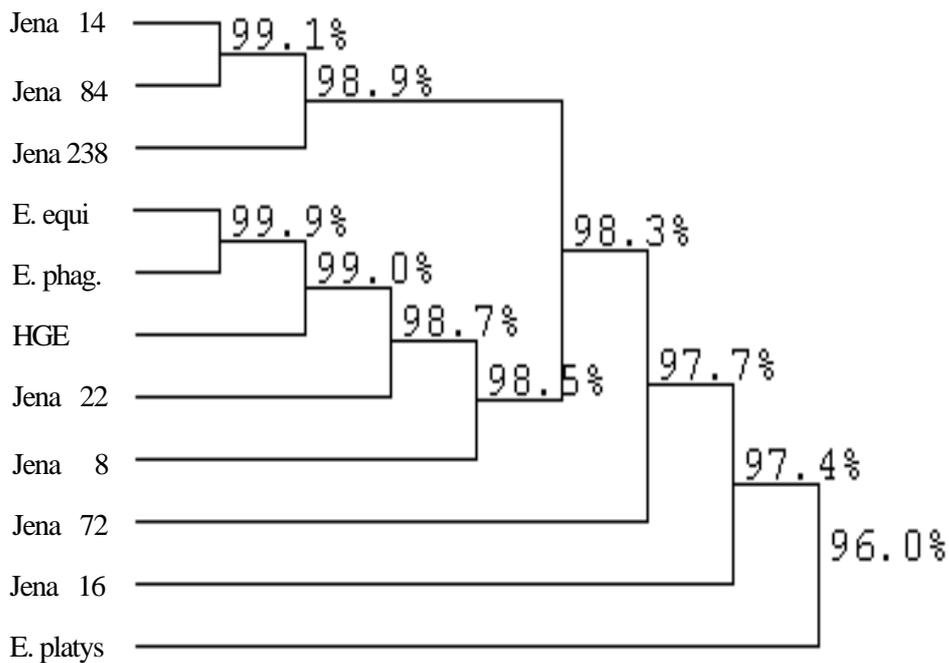
**Tab. 4.4.a:** Infektionsraten in Abhängigkeit vom Monat des Fangens

### **Sequenzanalyse:**

Anhand des verwendeten Bereiches des 16S rRNA Gens zeigte sich keine eindeutige Zuordnung der Sequenzen zu einem speziellen Vertreter der *E. phagocytophila* Gruppe. Vielmehr war eine 98,2 bis 99,9%-ige Übereinstimmung mit *E. phagocytophila*, HGE-agent und *E. equi*, hingegen eine geringere Ähnlichkeit von nur 96,0% mit *E. platys* zu verzeichnen. Mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes ließen sich die Verwandtschaftsverhältnisse zu bereits in anderen Regionen Europas oder Amerikas identifizierten Granulozytären Ehrlichien (GE) gut veranschaulichen (*Abb. 4.4.e*).

Bei keinem der Isolate ergab sich eine 100%-ige Übereinstimmung mit bereits in der NCBI-Datenbank vorhandenen Sequenzen. Daher wurden die Sequenzen dieser Arbeit in die NCBI-Datenbanken eingereicht und sind dort unter den folgenden Accession-Nummern registriert: Jena 8: AJ313513, Jena 14: AJ312941, Jena 16: AJ313512, Jena 22: AJ312939, Jena 72: AJ312940, Jena 84: AJ312942, Jena 238: AJ313511 (*Abb. 7.2.*, Anhang→Seite 92). Die Sequenzunterschiede der Ehrlichien in dieser Studie untereinander sind in der *Abb. 4.4.f* dargestellt.

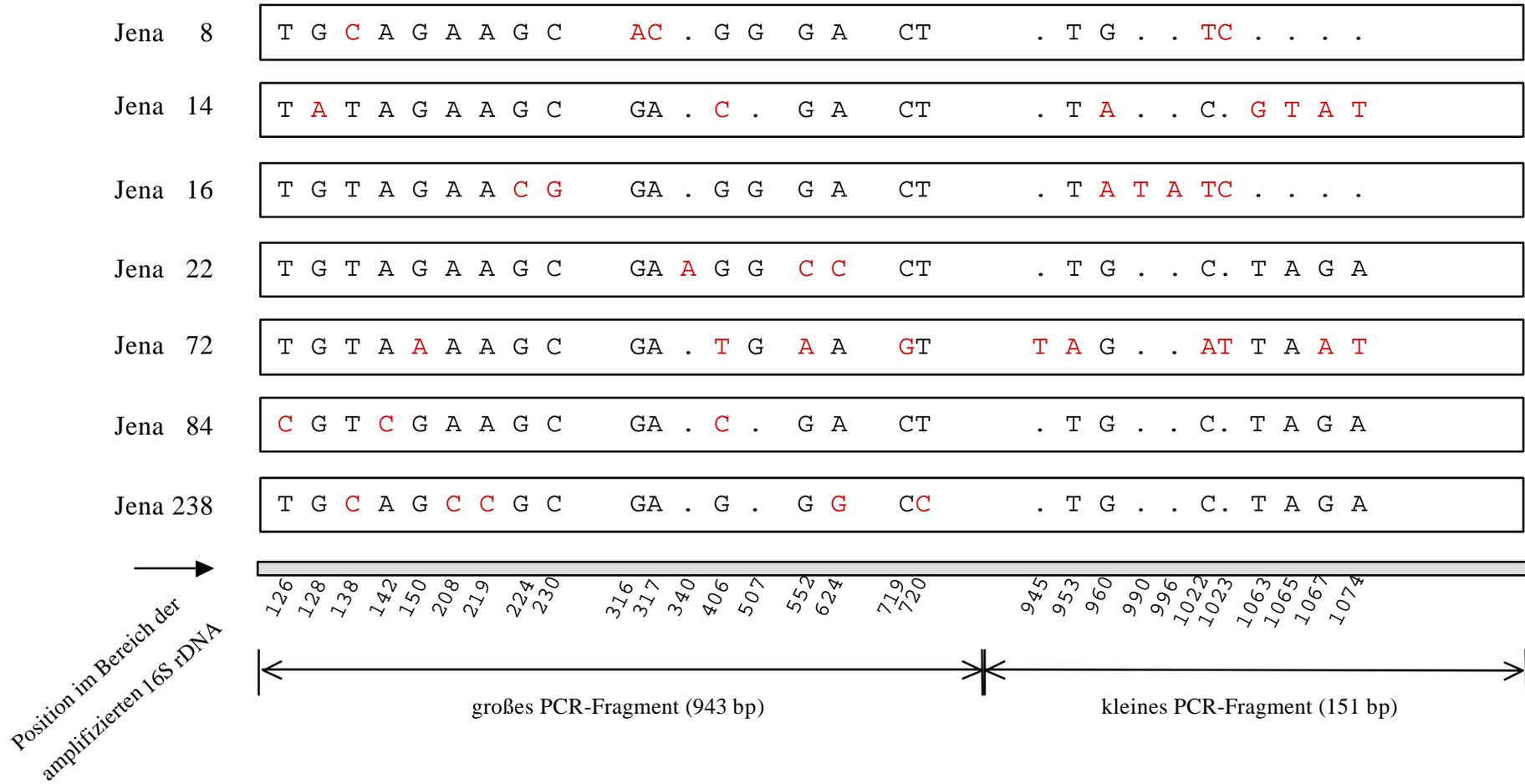
Ursache der geringen Variabilität ist die hohe Konservierung des Gens im Laufe der Evolution. Für eine genauere Differenzierung der Ehrlichien in die verschiedenen Spezies der *E. phagocytophila* Gruppe müßte ein weniger gut konservierter DNA-Bereich des Ehrlichia-Genoms ausfindig gemacht werden.



**Abb. 4.4.e:** Phylogenetischer Baum

In dem phylogenetischen Baum wurde ein Sequenzvergleich zwischen den in dieser Studie untersuchten Isolaten und verschiedenen, bereits bekannten Vertretern der *E. phagocytophila* Gruppe durchgeführt.

Jena 8, Jena 14, Jena 16, Jena 22, Jena 72, Jena 84 und Jena 238 bezeichnen die eigenen Sequenzen der Ehrlichien-positiven Zecken. Für die Beziehungen zu den anderen Ehrlichien wurden die Sequenzen aus der NCBI-Datenbank mit den folgenden Accession-Nummern verwendet: M73223.1 (*E. equi*), M73224.1 (*E. phagocytophila*), U02521 (HGE) und AF303467.1 (*E. platys*).



**Abb. 4.4.f:** Sequenzunterschiede der im Ilmtal detektierten Ehrlichien im amplifizierten Bereich des 16S rRNA Gens

#### 4.4.2. Borrelien: Verteilung, Entwicklungsstadium, saisonale Abhängigkeit,

##### Speziesdifferenzierung

- Verteilung:

Es ergab sich eine Gesamtinfektionsrate für Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes von 11,2% (34 von 305, *Abb. 4.4.a*→Seite 66). In den drei Gebieten waren die Prävalenzen unterschiedlich verteilt (*Abb. 4.4.b*→Seite 66):

⇒ Bad Berka: 15,4% Männchen (2 von 13), 16,7% Weibchen (3 von 18), 12,3% Nymphen (14 von 114), Total 13,1% (19 von 145)

⇒ Belvedere: 57,1% Männchen (4 von 7), 42,9% Weibchen (3 von 7), 1,5% Nymphen (1 von 66), Total 10,0% (8 von 80)

⇒ Dienststedt: 0% Männchen (0 von 8), 11,1% Weibchen (1 von 9), 9,5% Nymphen (6 von 63), Total 8,8% (7 von 80)

In allen drei Gebieten wurden infizierte Zecken gefunden, wenn auch in unterschiedlicher Anzahl. Es traten Infektionsraten von 0% bis 57,1% bei den Männchen, 11,1% bis 42,9% bei den Weibchen und 1,5% bis 12,3% bei den Nymphen auf. Auffällig ist, daß in Dienststedt kein Männchen den Erreger aufwies und sich dort insgesamt die niedrigste Infektionsrate zeigte.

- Entwicklungsstadium:

Von insgesamt 11,2% (34 von 305) mit Borrelien infizierten Zecken betraf dies im einzelnen 21,4% der Männchen (6 von 28), 20,6% der Weibchen (7 von 34) und 8,6% der Nymphen (21 von 243, *Abb. 4.4.c*→Seite 67). Prozentual waren mehr Adulte (21,0%) als Nymphen (8,6%) befallen.

- Saisonale Abhängigkeit:

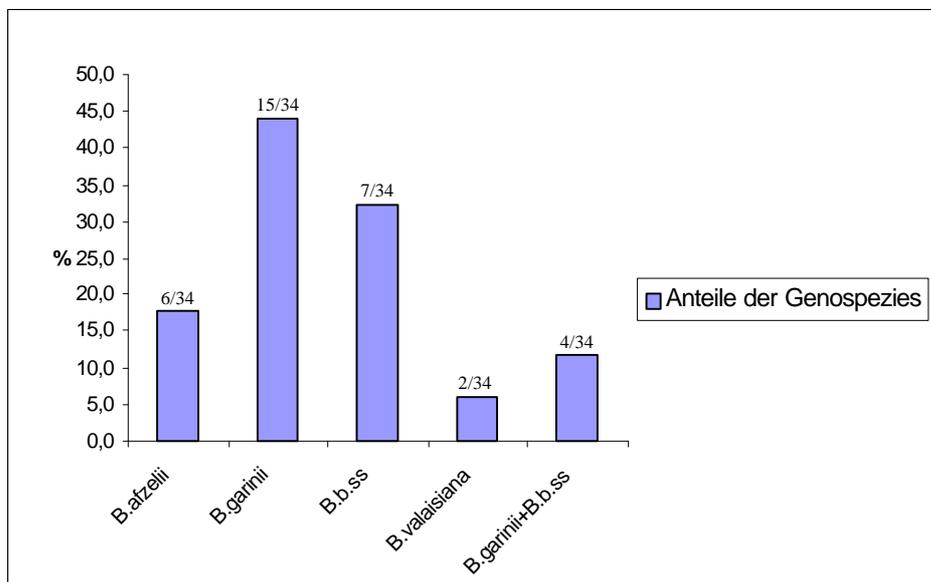
Von den 34 betroffenen Zecken wurden 1 im Mai, 9 im Juni, 12 im Juli, 4 im August, 4 im September und 4 im Oktober gesammelt (*Tab. 4.4.a*→Seite 68). Es waren deutlich mehr Zecken im Sommer (Juli / August) als im Frühjahr (Mai / Juni) oder Herbst (September / Oktober) infiziert (*Abb. 4.4.d*→Seite 67). Es konnte aber kein kontinuierlicher Anstieg der Prävalenz im Laufe des Jahres beobachtet werden.

▪ Speziesdifferenzierung:

Im untersuchten Ilmtal waren von den 34 positiven Zecken 17,7% mit *B. afzelii* (6 von 34), 44,1% mit *B. garinii* (15 von 34), 20,6% mit *B. burgdorferi* sensu stricto (7 von 34), 5,9% mit *B. valaisiana* (2 von 34) und 11,8% mit *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto (4 von 34) gleichzeitig infiziert. Auffällig ist, daß *B. afzelii* und *B. b.* sensu stricto v.a. in Weibchen vertreten waren, *B. garinii* in Männchen und *B. valaisiana* sowie die Doppelinfektionen *B. garinii* / *B. b.* sensu stricto in Nymphen dominierten (Tab. 4.4.b, Abb. 4.4.g).

	Zecken positiv / gesammelt	B.afzelii positiv	B.garinii positiv	B.b. ss positiv	B.valaisiana positiv	B.garinii+B.b.ss positiv
Männchen	6 / 28	2	4	0	0	0
Weibchen	7 / 34	3	2	2	0	0
Nymphen	21 / 243	1	9	5	2	4
Total	34 / 305	6	15	7	2	4

**Tab. 4.4.b:** Anteilmäßige Verteilung der Vertreter des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium



**Abb. 4.4.g:** Prävalenz der einzelnen Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes

#### 4.4.3. Koinfektion

Bezogen auf alle Zecken betrug die Koinfektionsrate 0,7% (Abb. 4.4.a→Seite 66). Im Ilmtal waren von den 7 mit Ehrlichien infizierten Zecken 2 gleichzeitig auch positiv für Borrelien, ein Männchen und eine Nymphe aus den Gebieten Bad Berka und Belvedere (Abb. 4.4.b→Seite 66, 4.4.c→Seite 67), die beide im Monat September gesammelt wurden (Tab. 4.4.a→Seite 68). Anhand des Restriktionsverdau zeigte sich in beiden Fällen das Vorkommen des Erregers *B. garinii*, welcher auch insgesamt am häufigsten vertreten war.

In Dienstedt, wo eine Ehrlichien-Infektion nicht nachgewiesen werden konnte, war ebenfalls kein Männchen mit Borrelien infiziert und die niedrigste Borrelien-Infektionsrate innerhalb der drei untersuchten Gebiete zu finden. Aufgrund der niedrigen Rate der Koinfektion scheint nur ein zufälliger Zusammenhang zwischen dem Auftreten beider Erreger zu bestehen.

#### 4.4.4. Statistik

Sowohl beim Fisher exact test als auch bei der linearen Trendgerade wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet.

- Infektionsraten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

Bezüglich der Infektion der Zecken mit Ehrlichien zeigte sich eine signifikant höhere Prävalenz des Erregers in Adulten als in Nymphen ( $p = 0,022$ ). Diese Signifikanz war auch für die mit Borrelien infizierten Zecken zu finden ( $p = 0,021$ ). Dabei wurden die Kreuztabellen Tab. 7.1. verwendet (Anhang→Seite 98).

- regionale Unterschiede der Infektionsraten

Sowohl die Prävalenzunterschiede der Ehrlichien- als auch der Borrelieninfektion innerhalb der drei Habitate Bad Berka, Belvedere und Dienstedt ergaben keine Signifikanz ( $p > 0,05$ ). Es wurden die Kreuztabellen Tab. 7.2. verwendet (Anhang→Seite 99).

- saisonale Abhängigkeit der Infektionsraten

Die Vermutung der Zunahme der Ehrlichieninfektion im Laufe des Jahres konnte mit einer linearen Trendgerade unterstützt werden ( $p = 0,05$ ). Dagegen zeichnete sich bei den Borrelien kein linear ansteigendes Infektionsmuster ab ( $p > 0,05$ ). Für die Abschätzungen wurden die Kreuztabellen Tab. 7.3. verwendet (Anhang→Seite 100).

▪ Konfidenzintervalle

Für die Infektionsraten der Männchen, Weibchen und Nymphen mit dem jeweiligen einzelnen Pathogen oder beiden Erregern wurden Konfidenzintervalle berechnet. Durch eine ansteigende Anzahl untersuchter Zecken verkleinern sich die Intervalle, wodurch die Ergebnisse näher an die tatsächliche Prävalenz heranreichen und weniger dem Zufall unterliegen. Die Werte sind so zu interpretieren, daß die in dieser Studie eruierten Prozentwerte der Infektionsraten mit 95%iger Wahrscheinlichkeit in den tatsächlichen, durch untere und obere Grenzen abgeschätzten, Bereichen liegen. So liegt z.B. die gefundene totale Koinfektionsrate für Ehrlichien und Borrelien von 0,7% (2 von 305) mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit in dem tatsächlichen Bereich zwischen 0,08% und 2,4% (Tab. 4.4.c).

⇒ Infektionsrate für Ehrlichien

Entwicklungs- stadium	Ehrlichien positiv	relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	1/28	0,0357	0,0009	0,1835	0,1<3,6<18,4
Weibchen	3/34	0,0882	0,0186	0,2368	1,9<8,8<23,7
Nymphen	3/243	0,0123	0,0026	0,0375	0,3<1,2<3,8
Total	7/305	0,0230	0,0093	0,0467	0,9<2,3<4,7

⇒ Infektionsrate für Borrelien

Entwicklungs- stadium	Borrelien positiv	relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	6/28	0,2143	0,0830	0,4095	8,3<21,4<41,0
Weibchen	7/34	0,2059	0,0870	0,3790	8,7<20,6<37,9
Nymphen	21/243	0,0864	0,0543	0,1291	5,4<8,6<12,9
Total	34/305	0,1115	0,0784	0,1523	7,8<11,2<15,2

⇒ Koinfektion mit Ehrlichien und Borrelien

Entwicklungs- stadium	Koinfektion positiv	relative Häufigkeit	gu 95%	go 95%	Konfidenzintervall in %
Männchen	1/28	0,0357	0,0009	0,1835	0,1<3,6<18,4
Weibchen	0	0	0	0,1028	0<0<10,3
Nymphen	1/243	0,0041	0,0001	0,0227	0,01<0,4<2,3
Total	2/305	0,0066	0,0008	0,0235	0,08<0,7<2,4

**Tab. 4.4.c:** Konfidenzintervalle für die Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien

Dargestellt sind die unteren (gu) und oberen (go) Grenzen der 95 %igen Konfidenzintervalle für die relativen Häufigkeiten der jeweiligen Infektionsraten der Zecken mit Ehrlichien und / oder Borrelien. In den angegebenen Konfidenzintervallen in % stellt der 1. Wert die untere Grenze, der mittlere Wert den in dieser Studie erhobenen Anteil infizierter Zecken und der letzte Wert die obere Grenze des Intervalls dar.

## 5. Diskussion

### 5.1. Ehrlichien

#### 5.1.1. Prävalenz

Der Vergleich der Prävalenz von Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe in Zecken als Überträger verschiedener Regionen der Welt läßt große Unterschiede sowohl zwischen Ländern Europas, als auch zwischen Europa, Amerika und Asien erkennen (*Tab. 5.1.1.*).

Land	Prävalenz	Quellenangabe
Deutschland:		
▪ Baden-Württemberg	2,2%, 2,8%	[77]
▪ München	1,6%	[59]
▪ Ilmtal	2,3%	[vorliegende Arbeit]
China	0,6%	[32]
Connecticut	6,8%-12,7%	[113]
Italien	24,4%	[37]
Norwegen	11,5%, 6%	[92]
Schweden		[183]
▪ Ostküste	3,1%	
▪ Westküste	9,2%	
Schweiz	2,0%, 1,3%	[104]
Slovenien	3,2%	[108, 149]
Spanien	9,5%	[191]
South New York State	13.0% +/- 3,2%	[43]
GB	7%	[75]
Polen	19,2%	[193]
Russland	1,9%	[3]

**Tab. 5.1.1.:** Ehrlichien-Infektionsraten anderer Untersuchungen

In der Literatur sind bisher die in der Tabelle dargestellten Infektionsraten mit Ehrlichien in *Ixodes ricinus* Zecken beschrieben.

Die in dieser Studie erhobene Infektionsrate von 2,3% liegt sehr nahe an den Ergebnissen anderer deutscher Regionen [18, 59, 77].

In den meisten der oben aufgeführten Untersuchungen waren mehr Adulte als Nymphen mit dem Erreger infiziert. Lediglich in Schottland wird eine höhere Rate an infizierten Nymphen beschrieben (Nymphen: 3,3%; adulte Zecken: 1,5%), wobei als mögliche Ursachen das leichtere Fangen und die geringeren Dichteschwankungen der Nymphen vermutet werden [4]. Auch im Ilmtal konnte eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der Entwicklungsstadien beobachtet werden. Dabei waren 6,5% der Adulten (4 von 62) und 1,2% (3 von 243) der Nymphen mit Ehrlichien infiziert. Im Gegensatz zur Studie von Fingerle et al. [59], in der keine Ehrlichien-positive Nymphe in Süddeutschland identifiziert wurde, konnten in der vorliegenden Arbeit in Thüringen 3 positive Nymphen detektiert werden (*Abb. 4.4.c*→Seite 67).

Die Verteilung der Ehrlichien scheint nur lokal zu sein. So war in einem der 3 Gebiete (Dienstedt) keine der 80 dort gefangenen Zecken infiziert (*Abb. 4.4.b*→Seite 66). Diese Resultate stehen im Einklang mit den Veröffentlichungen der Münchner [59] und der New Yorker [43] Arbeitsgruppen.

In Schottland wird eine ganzjährig gleich hohe Erreger-positive Zeckenzahl diskutiert [4], wogegen in Großbritannien zwei Häufigkeitsgipfel, je einer im Frühsommer und im Herbst beschrieben wurden [75]. Eine saisonale Abhängigkeit mit zunehmender Infektiosität gegen Ende des Jahres läßt sich aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Studie nur vermuten (*Abb. 4.4.d*→Seite 67, *Tab. 4.4.a*→Seite 68). Die insgesamt relativ niedrige Infektionsrate erfordert allerdings eine größere Anzahl untersuchter Zecken zur Bestätigung.

### 5.1.2. Typisierung

Viele der bisher durchgeführten Prävalenzstudien für Ehrlichien der *E. phagocytophila* Gruppe wie diese Arbeit beruhen auf dem Nachweis des 16S rRNA Gens. HGE-agent, *E. phagocytophila*, und *E. equi* aus verschiedenen Teilen der Welt zeigen aber in diesem DNA-Bereich nur einige wenige Unterschiede [34, 61, 207, 220]. Es gelang daher auch nicht, die hier untersuchten Sequenzen aus dem Ilmtal weiter zu differenzieren. Lediglich bezüglich *E. platys* aus der *E. phagocytophila* Gruppe ergaben sich mit 96% Identität größere Unterschiede zu Sequenzen in der NCBI-Datenbank (*Abb. 4.4.f*→Seite 70). Es ergibt sich die Frage, warum ein Organismus mit einer so breiten geographischen Verteilung und einem so vielfältigen

Spektrum an Wirtsorganismen eine geringe genetische Variabilität im Bereich des 16S rRNA Gens aufweist. Aufgrund der hohen Konservierung der 16S rDNA im Laufe der Evolution sollte man ein anderes Gen, das sich für eine Differenzierung der Erreger der granulozytären Ehrlichiose besser eignet, suchen.

### 5.1.3. Ausblick

Neue Ansätze für phylogenetische Untersuchungen bei Ehrlichien bieten das *groESL* Operon oder das Zitrat-Synthase Gen. Beide DNA-Bereiche sind verglichen mit der 16S rDNA weniger stark konserviert.

Das *groESL* Operon ist zusammengesetzt aus einem streßinduzierbarem Promotor, gefolgt von einem ORF für ein 10- bis 20-kDa Protein (GroEL), einer in ihrer Länge zwischen verschiedenen Bakterien variierenden nichtkodierenden Sequenz ("spacer") und einer ORF für ein 58- bis 65-kDa Protein (GroES). GroES ist ein allgemeines bakterielles Antigen, welches Verwandtschaft mit der eukaryotischen HSP60-Familie zeigt [190, 223].

Das Zitrat-Synthase Gen (*gltA*) kodiert das erste Enzym des Trikarbonsäurezyklus, dem Schlüssel zur Regulation der intrazellulären ATP-Synthase nahezu aller lebenden Zellen. Die Sequenzen erlauben eine bessere Unterscheidung nahe verwandter Spezies im Vergleich zum 16S rRNA Gen [88].

Sowohl die bisherigen phylogenetischen Vergleiche der *groESL* Operons verschiedener Ehrlichienisolate, als auch der Zitrat-Synthase Gene bestätigten die verwandtschaftlichen Beziehungen, die auf der Basis des 16S rRNA Gens ermittelt wurden. Zudem ergaben sich noch z.T. noch feinere Differenzierungen zwischen den verschiedenen Ehrlichien Genogruppen und ihren Spezies [190].

Die zukünftige Diagnostik einer Ehrlichieninfektion aus Patientenmaterial könnte auf dem *groESL* Operon basieren, da die "spacer" Region sehr speziesspezifisch ist. Anstelle einer „nested“ PCR wäre eine sensitive Hybridisierung mit geringerer Anfälligkeit des Verfahrens für Kontaminationen denkbar.

Neben den phylogenetischen Beziehungen der Ehrlichien ist es außerdem wichtig, nähere Informationen über die Virulenz oder deren Interaktionen mit anderen Pathogenen zu erhalten. Trotz Ehrlichien infizierter Zecken in nahezu allen europäischen Ländern entwickelten bisher nur verhältnismässig wenige Menschen das klinische Bild einer humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE) im Vergleich zu wesentlich häufigerem Auftreten

humanpathogener Fälle in Amerika. Ursache dafür könnten viele unerkannte Krankheitsfälle bei sehr mildem Verlauf oder unzureichender Diagnostik sein. Vielleicht könnten Untersuchungen von Patienten mit unklarem Fieber, Sepsis oder Multiorganversagen auf Ehrlichien spezifische DNA Hinweise über die Prävalenz beim Menschen geben. Es wird aber auch eine veränderte Pathogenität des Erregers in Europa diskutiert. Bedeutsam für diese Frage könnte das ank Gen (ank steht für Ankyrin "repeats") sein. Genetische Analysen ergaben eine hohe Konservierung dieses Gens, weshalb es sich nicht für die Differenzierung nahe verwandter Spezies eignet. Es wurden 3 verschiedene Klassen gefunden: je eine im Nordosten der USA, im hohen mittleren Westen der USA und in Europa. Das kodierte Anka Protein beeinflusst wahrscheinlich die Genexpression der Wirtszelle. Die genaue Funktion des Proteins für die Ehrlichien ist noch unklar. In der Diskussion sind die Beeinflussung der Kommunikation mit der Wirtszelle über Ankyrine oder die potentielle Möglichkeit der Regulation der Wirtszell-Transkription proinflammatorischer Zytokine [31, 120].

## **5.2. Borrelien**

### **5.2.1. Prävalenz**

Der Vergleich der Prävalenzen von Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in Zecken aus unterschiedlichen Gebieten der Erde läßt sowohl Unterschiede verschiedener Regionen, als auch Unterschiede innerhalb einer Region in aufeinanderfolgenden Jahren erkennen (*Tab. 5.2.1.*).

Land	Prävalenz	Quellenangaben
Deutschland:		
▪ Berlin	27%	[174]
▪ Brandenburg	22,8%	[174]
▪ Ilmtal	25,1% (1995)	[48]
	14,0% (1996)	[48]
	11,2% (2000)	[vorliegende Arbeit]
▪ München	12,6% , 36,2%	[59]
Connecticut	23,7%	[113]

Finnland	9,5%	[93]
Italien	19,8%	[37]
New York		[43]
▪ Nord	12,5%	
▪ Mitte	7,5%	
▪ Süd	22,1%	
Niederlande	13%	[173]
Norwegen	16%, 17%	[92]
Schweiz	49%	[104]
Slovenien	33%	[66]
GB	37%	[75]
Polen	11,6%	[193]
Russland	46,9%	[3]

**Tab. 5.2.1.:** Borrelien-Infektionsraten anderer Untersuchungen

In der Literatur sind bisher folgende in der Tabelle dargestellten Infektionsraten der Zecken mit Borrelien aus dem *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplex beschrieben.

Nach Veröffentlichungen des Robert-Koch-Institutes ("<http://www.rki.de>") liegen die Häufigkeiten der infizierten Zecken mit Borrelien in Deutschland zwischen 5% und 35%. Davon sind im Durchschnitt 20% der Adulten, 10% der Nymphen und 1% der Larven befallen [164]. Außerhalb Deutschlands werden jedoch auch wesentlich höhere Prävalenzen beschrieben, wobei in allen Fällen adulte Zecken höhere Infektionsraten aufweisen. Im Ilmtal wurden schon 1995 und 1996 Untersuchungen zur Prävalenz von Borrelien durchgeführt. In beiden Jahren war die Infektionsrate in Dienststedt am höchsten, gefolgt von Bad Berka und Belvedere. In einer zu dieser Arbeit parallel durchgeführten Studie [187] über die Prävalenz von Borrelien in den gleichen Habitaten wurden die verschiedenen Vertreter des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes mittels Kultur aus den Zecken und anschließender PCR nachgewiesen. Dabei war die Infektionsrate für Borrelien in Bad Berka höher als in Belvedere und in Dienststedt am niedrigsten. Bezüglich des Entwicklungsstadiums infizierter Zecken dominierten adulte Zecken im Vergleich zu Nymphen ohne größere Unterschiede zwischen infizierten Männchen und Weibchen. Diese Ergebnisse stehen mit denen aus den vorliegenden Untersuchungen sowohl in der Reihenfolge der anteilmäßigen Verteilung der Borrelieninfektionen in den drei Arealen, als auch in der überwiegenden Infektion der Adulten im Einklang (Abb. 4.4.c→Seite 67). Lediglich in Dienststedt war eine unterschiedliche

Präsenz des Erregers in Männchen (0%) und Weibchen (11,1%) zu beobachten (Abb. 4.4.b→Seite 66). Die Infektionsrate für Borrelien (11,2%) lag insgesamt wesentlich höher als die für Ehrlichien (2,3%) (Abb. 4.4.a→Seite 66, Tab. 4.4.a→Seite 68), was auch in anderen Untersuchungsgebieten beschrieben wurde [3, 37, 43, 174].

Die 1995 / 1996 im Ilmtal beobachtete Abhängigkeit der Infektionsrate von der Jahreszeit [48] ließ sich nicht ausreichend bestätigen. Vielmehr zeigten sich zwei Häufigkeitsgipfel, je einer im Monat Juli und Oktober (Abb. 4.4.d→Seite 67, Tab. 4.4.a→Seite 68), ähnlich den Resultaten von Beate Steil [187] mit den größten Prävalenzen im Juli und September.

### 5.2.2. Speziesdifferenzierung

Das Vorkommen der einzelnen Spezies scheint regional sehr unterschiedlich zu sein. Für Europa wird *B. garinii* mit 44% als dominant betrachtet, nachfolgend *B. afzelii* mit 27%, *B. burgdorferi* sensu stricto mit 19% und *B. valaisiana* mit 10,5% [65, 83, 169].

*B. burgdorferi* sensu stricto ist in Westeuropa häufiger zu finden als in Osteuropa. *B. valaisiana* wurde bisher von Zecken aus 8 europäischen Ländern isoliert: Deutschland, Irland, Italien, Kroatien, Niederlande, Schweiz, Tschechien und UK. Vögel sollen wahrscheinlich die einzigen Überträger für *B. valaisiana* sein [169].

Auch die Koinfektion von Zecken mit mehr als einem Vertreter des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes sind in unterschiedlicher Prävalenz beschrieben, wobei das kombinierte Auftreten von *B. afzelii* mit *B. garinii* und von *B. garinii* mit *B. b.* sensu stricto dominiert.

In einer aktuellen Arbeit im Institut für Ernährungswissenschaften in Jena [187] wurden die verschiedenen Vertreter des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in absteigender Häufigkeit als *B. garinii*, *B. b.* sensu stricto, *B. valaisiana* und *B. afzelii* identifiziert. Außerdem traten in 9,1% der Fälle Koinfektionen mit *B. garinii* und *B. b.* sensu stricto auf. Zusätzlich wurden Doppelinfektionen der Zecken mit *B. afzelii* und *B. b.* sensu stricto (1,6%) bzw. *B. afzelii* und *B. garinii* (0,8%) beobachtet. In der vorliegenden Studie in den gleichen Habitaten im Ilmtal waren von den 34 positiven Zecken 17,7% mit *B. afzelii* (6 von 34), 44,1% mit *B. garinii* (15 von 34), 20,59% mit *B. burgdorferi* sensu stricto (7 von 34), und 5,88% mit *B. valaisiana* (2 von 34) infiziert. Eine Doppelinfektion mit *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto trat in 11,76% (4 von 34) auf (Abb. 4.4.g→Seite 72, Tab. 4.4.c→Seite 74).

### 5.2.3. Ausblick

Kandidaten für die Entwicklung einer Vakzine sind die Gene OspA und OspC. Während der Blutmahlzeit wird die Expression von OspC nach Erreichen eines kritischen Gewichtes hochreguliert. OspA bleibt dagegen während des ganzen Saugens auch in der Abwesenheit von OspC präsent. OspC ist entscheidend für die Vektorausbreitung und Infektiosität. Die häufig höhere Infektionsrate für Borrelien in vollgesogenen Zecken erklärt sich aus der durch den Blutkontakt geförderten Erregervermehrung. Bei der Übertragung der Borrelien auf den Menschen, scheint der neue Wirt individuell die Expression von OspA und / oder OspC oder der Abwesenheit beider Proteine 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 [214, 217, 218].

In verschiedenen Studien wurde eine Assoziation bestimmter Borrelien-Spezies mit einer charakteristischen Manifestation beim Menschen diskutiert. Das Erythema migrans soll von allen Spezies gleichermaßen hervorgerufen werden, während *B. garinii* v.a. für die Neuroborreliose, *B. afzelii* für die Akrodermatitis chronica atrophicans und *B. burgdorferi* sensu stricto für die Lyme-Arthritis verantwortlich zu sein scheint. Diese Zusammenhänge wurden vorwiegend in Amerika beobachtet. Ihre Gültigkeit für Europa wird z.T. kontrovers diskutiert. Während inzwischen die vier Spezies *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *Borrelia bissettii* als sicher humanpathogen gelten, wird für *B. valaisiana* die Humanpathogenität vermutet [169].

Interessant ist daher die Frage, ob entsprechend der in dieser Arbeit dominierenden Spezies *B. garinii* auch die Neuroborreliose unter den klinischen Symptomen der Borreliose im Untersuchungsgebiet am stärksten vertreten ist. In einer norwegischen Studie war *B. afzelii* dominierend, als häufigste klinische Manifestation wurde jedoch die Neuroborreliose beobachtet [92]. Zur Beurteilung dieser Fragestellung ist zukünftig eine enge Zusammenarbeit mit Neurologen, Rheumatologen oder Dermatologen erforderlich.

### **5.3. Koinfektionen**

#### **5.3.1. Prävalenz**

Im Vergleich der Koinfektionsraten von Zecken mit Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe und Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes zeigten sich Werte von 0,7% in Deutschland [18] bis maximal 8,1% in Italien [37] (Tab. 5.3.1.).

Land	Prävalenz	Quellenangaben
Deutschland:		
▪ Baden-Württemberg	0,7%, 1,0%, 0,8%	[18, 77]
▪ Ilmtal	0,7%	[vorliegende Arbeit]
▪ München	0,8%	[59]
Connecticut	6,7%	[113]
Italien	8,1%	[37]
New York	1,9% +/- 2,2%	[43]
Niederlande	4,1%	[175]
Schweiz	2,0%	[104]
GB	1,7%	[73]
Polen	5%	[193]
Russland	6,7%	[3]

**Tab. 5.3.1.:** Koinfektionsraten anderer Untersuchungen

In verschiedenen Studien wurden die folgenden in der Tabelle dargestellten Koinfektionsraten für Ehrlichien und Borrelien beschrieben.

Bezüglich der Koinfektion liegt die Vermutung nahe, daß jeder der beiden Erreger unabhängig vom anderen durch Zecken übertragen wird. Somit ist eine Doppelinfektion möglich und auch nachweisbar, allerdings wahrscheinlich das Resultat der individuellen Infektionsraten [3, 18, 37, 43, 59, 113, 175, 193].

Im Ilmtal waren 2 der 7 mit Ehrlichien infizierten Zecken gleichzeitig auch positiv für Borrelien. Bezogen auf alle Zecken betrug die Koinfektionsrate somit 0,7% (2 von 305). Anhand des Restriktionsverdaus zeigte sich in beiden Fällen das Vorkommen des Erregers *B. garinii*, welcher auch insgesamt am häufigsten vertreten war. Es waren ein Männchen aus

Belvedere und eine Nymphe aus Bad Berka koinfiziert. Beide Zecken wurden im Herbst (Monat September) gefangen.

In Dienstedt, wo eine Ehrlichien-Infektion nicht nachgewiesen werden konnte, war ebenfalls kein Männchen mit Borrelien infiziert und die niedrigste Borrelien-Infektionsrate innerhalb der drei untersuchten Gebiete zu finden (Abb. 4.4.a→Seite 66, Abb. 4.4.b→Seite 66, Abb. 4.4.c→Seite 67, Abb. 4.4.d→Seite 67, Tab. 4.4.a→Seite 68).

### 5.3.2. Bewertung

Die vorliegenden Resultate und die aus veröffentlichten Studien beschriebenen unterliegen bestimmten Einflußgrößen, wie z.B. der Dichte der Zeckenpopulation im Untersuchungsgebiet, Verteilung der Zecken in der Umwelt, jährliche Dichteschwankungen der Nymphen-Populationen oder der schwankenden Infektionsrate mit dem jeweiligen Pathogen. Der entscheidende Faktor für variable Häufigkeiten der Infektion mit Ehrlichien oder Borrelien konnte jedoch noch nicht identifiziert werden [43].

Die Anzahl der Zecken in einem Habitat ist determiniert durch die Möglichkeit, ihren Lebenszyklus zu beenden. Voraussetzung dafür ist, daß genügend Wirte für alle Entwicklungsstadien zur Verfügung stehen. Als Ursachen für unterschiedliche Infektionsraten zwischen den Entwicklungsstadien kommen verschiedene Wirtsorganismen der weiblichen und männlichen unreifen Zecken in Betracht. Aber auch die variable Überlebensrate der Erreger in Männchen, Weibchen und Nymphen, sowie die Existenz der infizierten Zecken in Abhängigkeit von ihrem immunologischen Status scheinen wichtige Faktoren für die erhobene Prävalenz von Ehrlichien und Borrelien zu sein. Bei den prozentualen Angaben der infizierten adulten Zecken und Nymphen muß der Monat des Fangens mit in die Betrachtung einbezogen werden, da die Aktivität der Nymphen im Frühjahr am größten ist und die Dichte der Adulten gegen Ende des Jahres ansteigt [3, 140, 200]. Ein Gipfel der Anzahl wirtssuchender Zecken ist im Frühsommer (Mai / Juni) zu finden. Die Sommeraktivität der Zecken richtet sich je nach Witterung und Standort. In sonnig-warmen, regenarmen Jahren und sonnenexponierten Standorten geht die Aktivität der Zecken oftmals zurück, so daß man eine zweigipflige Saisondynamik von *Ixodes ricinus* mit Aktivitätsspitzen im Frühsommer und Herbst beobachten kann. Dagegen unterdrücken feucht-kühle, wenig sonnige Jahre und wenig sonnenexponierte, nicht zu trockene Standorte diese Zweigipfligkeit [94].

Für die Bedeutung der Koinfektionen in Zecken und deren Übertragung auf den Menschen sind Untersuchungen an exponierten Personengruppen geeignet. In einer Münchner Studie

wurden Waldarbeiter und Lyme-Patienten auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen HGE untersucht. Innerhalb der Personengruppe mit häufigem Aufenthalt im Wald fanden sich zu 14% AK gegen HGE, bei Lyme-Patienten in 11,4%. In der gesunden Kontrollgruppe ohne bekannten Zeckenbiß wurde eine wesentlich geringere AK-Prävalenz (1,9%) gegen HGE festgestellt [56].

In Untersuchungen aus Wisconsin und Minnesota konnten in 5,2% der mit Borrelien infizierten Personen auch Ehrlichien-AK nachgewiesen werden [126].

Das gemeinsame Vorkommen von HGE und Lyme-Borreliose muß daher bei Personen mit Fieber unklarer Genese und Zecken-Exposition in Europa ebenso in Erwägung gezogen werden wie in Amerika. Da man davon ausgehen kann, daß wesentlich weniger *Ixodes ricinus* Zecken mit Ehrlichien als mit Borrelien infiziert sind, muß man auch mit entsprechend seltenerem Auftreten der humanen granulozytären Ehrlichiose im Vergleich zu Manifestationen der Lyme-Borreliose rechnen. Wichtig ist es jedoch, an die Möglichkeit einer Infektion mit einem der Pathogene oder beiden Erregern zu denken. Neben den Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Ehrlichien und Borrelien in Zecken werden weitere Studien zur Pathogenität beim Menschen erforderlich sein, aber auch das Propagieren der Problematik unter den Ärzten für die frühzeitige Erfassung von Krankheitsfällen.

## **5.4. Vielfalt der Nachweisverfahren**

### 5.4.1. Ehrlichien

Zum Nachweis der Ehrlichien aus Zecken- oder Patientenmaterial mittels PCR eignen sich unterschiedliche genetische Bereiche. Am häufigsten wird das auch in dieser Studie verwendete 16S rRNA Gen verwendet mit verschieden großen amplifizierten Abschnitten [3, 37, 59, 92, 175]. Vorteil des Gens ist durch die hohe Konservierung die geringere Mutationshäufigkeit, die bei der Auswahl neuer Primer genutzt werden kann. Die in den vorliegenden Untersuchungen durchgeführte PCR des kleinen Fragmentes zeigte z.T. unspezifische Banden, weshalb sie durch die PCR des großen Fragmentes ergänzt wurde. Für nachfolgende Untersuchungen wäre eine "nested" PCR in Erwägung zu ziehen, wie sie auch bereits von anderen Wissenschaftlern durchgeführt wird [18, 35, 119]. Andere verwendete Genbereiche für den Nachweis des Erregers sind das *gltA* Gen (Zitrat-Synthase Gen) [88], das *groESL* Operon [34, 190, 223], das ank Gen (zytoplasmatisches Protein Antigen kodierendes Gen mit "ankyrin repeats") [31, 34, 120] oder das p44 Gen (ein 44 kDa großes Oberflächen

Protein kodierendes Gen) [34]. Für das p44 Gen ist neben der Sequenzierung das RFLP-Verfahren beschrieben. Es ist vorteilhaft, sich vor Beginn der Untersuchungen zu entscheiden, ob phylogenetische oder pathogenetische Kriterien im Vordergrund stehen, um danach entsprechend einen der genannten Genbereiche auszuwählen. Des weiteren ist eine "semi-nested" PCR möglich [32] oder eine quantitative "real time" PCR [156]. In der Serodiagnostik dominiert der IFA mit Nachweis von IgG und / oder IgM Antikörpern. Ergibt sich bei einem Patienten der Verdacht auf eine Infektion mit Ehrlichien empfiehlt sich ein Vorgehen in folgender Reihenfolge: (1) Blutentnahme und Bestimmung wichtiger Parameter wie BSG, ALAT, ASAT, CRP oder LDH, (2) unter dem Lichtmikroskop betrachteter Giemsa gefärbter Blutausschlag, (3) IFA, (4) DNA-Extraktion von Leukozyten im "buffy coat" und anschließende PCR [108]. Die direkte Kultivierung aus Zecken in IDE8 Zellen [131] oder aus Humanserum in HL60 Zellen [73] ist bisher nur in wenigen Speziallaboren möglich.

#### 5.4.2. Borrelien

Auch bei dem Nachweis von Borrelien aus Zecken- oder Patientenmaterial mittels PCR werden verschiedene DNA-Bereiche verwendet. Oftmals werden die Plasmid kodierten Oberflächenproteine OspA, OspB oder OspC ausgewählt. In Anlehnung an Wilske et al. [217] wurde in der vorliegenden Arbeit das OspA Gen in einer "semi-nested" PCR detektiert. Weitere geeignete Genbereiche sind das Flagellin Gen [104, 105, 199], die intergenische "spacer" Region zwischen 5S rDNA und 23S rDNA [3, 97, 175] oder zwischen 16S rDNA und 23S rDNA [107], die 23S rDNA [116], sowie die 16S rDNA [42, 214, 217, 218]. Im Anschluß an die PCR ist die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte RFLP-Methode möglich, aber auch DNA-DNA-Hybridisierung [42, 217] oder Klonierung mit nachfolgender Sequenzierung [217, 218]. Der Vorteil von RFLP ist die Möglichkeit der Speziesdifferenzierung, die bei Doppelinfektionen mit mehr als einer Spezies mit der Sequenzierung oder DNA-DNA-Hybridisierung mitunter schwierig festzustellen ist. Andere angewandte Nachweisverfahren mit unterschiedlicher Spezifität und Sensitivität, die auch oft miteinander kombiniert werden, sind der IFA [48, 114, 128, 212], die Dunkelfeldmikroskopie [212], der ELISA [43, 212], PFGE [169] oder nach Kultivierung die SDS Gelelektrophorese und Immunoblot mit Verwendung von MAbs [198, 217, 218]. Die mikrobiologische Diagnose in der Praxis erfolgt v.a. durch den Nachweis spezifischer Antikörper. Es sollten Tests zur Ig-Klassifizierung (IgM-, IgG-ELISA oder IgM, IgG-Immunfluoreszenz) durchgeführt werden. Der Immunoblot kann ergänzend bei kritischen Fällen eingesetzt werden. Der kulturelle Nachweis der Erreger gelingt aus Biopsiematerial, Liquor und selten aus Blut

oder Gelenkflüssigkeit. Die PCR gewinnt zunehmend an Bedeutung und zeigt möglicherweise bei Gelenkpunktaten bessere Ergebnisse als die Kultur [212]. Für die Differenzierung unterschiedlicher Vertreter des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes in Untersuchungen zur Übertragung der Erreger zwischen verschiedenen Wirten wird ein reverser Hybridisierungsblot eingesetzt [175]. Je nach Zielstellung der gewünschten Untersuchungen zum Nachweis des Erregers und / oder zur genaueren Spezieseinteilung ist es zweckmäßig, ein geeignetes Verfahren auszuwählen.

#### 5.4.3. kritische Schlußbetrachtung der eigenen Methoden

Der Nachweis der Ehrlichien mit Hilfe der verwendeten PCR des kleinen Fragmentes und anschließender Sequenzierung erwies sich nicht als optimal. Zur Optimierung war die Klonierung der positiven PCR-Fragmente erforderlich, sowie die Analyse eines neu gewählten Bereiches im 16S rRNA Gen (großes Fragment). Die Erfahrungen aus dem Nachweis von Ehrlichien können für nachfolgende Untersuchungen anhand der in Thüringen aufgetretenen Erreger-Sequenzen genutzt werden. Es wäre z.B. möglich, positive Elektrophoresebanden mittels Restriktionsverdau auf der Grundlage der jetzt bekannten Sequenzen als Ehrlichien zu identifizieren. Eine Auswahl von Restriktionsorten ist in der Abb. 7.3. (Anhang→Seite 97) anhand der Sequenz von Jena 14 (Access.No: AJ312942) dargestellt. Wichtig bei der Auswahl eines geeigneten Enzyms ist die gute Trennbarkeit der entstehenden Restriktionsfragmente aufgrund ihrer bp-Anzahl, welche wiederum von der Größe des verwendeten DNA-Abschnittes abhängig ist.

Bei der "semi-nested" PCR zum Nachweis des OspA Gens der Borrelien traten keine unspezifischen Banden auf. Mittels RFLP war eine gute Unterscheidung der 4 Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes, sowie die Detektion von Doppelinfektionen mit mehr als einem Vertreter möglich. Das RFLP-Verfahren zur Differenzierung von *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. b.* sensu stricto und *B. valaisiana* wurde durch diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena etabliert. Ist man an der klaren Unterscheidung der verschiedenen Serotypen von *B. garinii* interessiert, müssen eventuell zusätzliche Verfahren angeschlossen werden. Mögliche Ursache für die nicht eindeutige Abgrenzung in einigen wenigen Fällen können sowohl nicht ganz optimale Restriktionsorte für alle Serotypen sein, als auch die enorme Heterogenität von *Borrelia garinii*.

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden 305 *Ixodes ricinus* Zecken (28 Männchen, 34 Weibchen, 243 Nymphen) aus den 3 Thüringer Gebieten Bad Berka, Belvedere und Dienstedt, welche im Ilmtal gelegen sind, auf eine Infektion mit Ehrlichien der *Ehrlichia phagocytophila* Genogruppe und Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes untersucht.

Zecken gehören zum Stamm der Gliederfüßler (Arthropoda) und bilden innerhalb der Klasse der Spinnentiere (Arachnida) und der Unterklasse Milben / Zecken (Acari) eine Überfamilie (Ixodoidea). Man findet drei Entwicklungsstadien: Larve, Nymphe und adulte Zecken. In jedem dieser Stadien ist eine Blutmahlzeit zur Weiterentwicklung erforderlich. Dabei nehmen sie vom jeweiligen Wirt auch verschiedene Erreger auf und können diese bei der nächsten Blutmahlzeit auf einen anderen Wirt übertragen. Die meisten Zeckenarten sind langlebig und widerstandsfähig gegenüber klimatischen Bedingungen. Insgesamt existieren mehr als 300 Arten, von denen in Deutschland der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*) mit 95%-igem Anteil am häufigsten vertreten ist. Eine Besonderheit bezüglich der Rolle als Vektor für verschiedene Erreger ist die intrazelluläre Verdauung und das chemische Milieu des Mitteldarms, in dem sich keine aggressiven Verdauungsenzyme befinden. Daher ist ein Überleben in Speicheldrüse und Magen-Darm-Trakt möglich, so daß sich die DNA-Extraktion auf diesen Bereich konzentrierte.

Ehrlichien sind obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien mit enger Verwandtschaft zu den Rickettsien. Die Übertragung erfolgt zum großen Teil durch Zecken, wobei sich die Erreger in der Speicheldrüse aufhalten und ein Saugakt von weniger als 24 h für die Übertragung ausreichend ist. Allerdings wird nur ein transstadieller und nicht ein transovarieller Weg beobachtet, so daß die Larven noch nicht infektiös sind, sondern erst Nymphen und adulte Zecken.

Die klinischen Symptome der humanen monozytären und granulozytären Ehrlichiose (HME und HGE) sind zum Teil auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten und Granulozyten zurückzuführen. Zur Therapie wird die Gabe von Tetracyclinantibiotika über 10 bis 14 Tage empfohlen,  $\beta$ -Laktamantibiotika sind bei einer Ehrlichieninfektion unwirksam.

Innerhalb der Subdivision der Purpurbakterien sind die Ehrlichien mit den Enterobakterien verwandt. Anhand der Sequenz des 16S rRNA Gens läßt sich eine Einteilung in drei Genogruppen vornehmen, wobei der jeweils als erstes charakterisierte Vertreter für den

Namen der Gruppe bestimmend ist: *Ehrlichia-canis*-Gruppe (I), *Ehrlichia-phagocytophila*-Gruppe (II) und *Ehrlichia-sennetsu*-Gruppe (III).

Für den Nachweis von Ehrlichien in dieser Studie wurde die 16S rDNA als template verwendet und mit Primern, spezifisch für die *Ehrlichia phagocytophila* Genogruppe mittels PCR amplifiziert. Der Sequenzvergleich der positiven Isolate erfolgte mit den Vertretern *E. phagocytophila* (M73224.1), HGE (U02521), *E. equi* (M73223.1) und *E. platys* (AF303467.1).

Zunächst diente ein 151 bp PCR-Produkt der Detektion der Erreger. Eine darauffolgende Klonierung konnte die Sequenzanalyse verbessern. In der Hoffnung, noch eine genauere Einordnung zu einem Vertreter der *Ehrlichia phagocytophila* Gruppe zu finden, wurde ein 943 bp PCR-Fragment aus dem gleichen Gen amplifiziert und kloniert.

Die Gesamtinfektionsrate für Ehrlichien im untersuchten Gebiet betrug 2,3% und im einzelnen für Männchen 3,6%, Weibchen 8,8% und Nymphen 1,2%. Die Verteilung scheint nur lokal zu sein, da in Dienststedt keine infizierte Zecke nachgewiesen werden konnte. Prozentual waren mehr Adulte (6,5%) als Nymphen (1,2%) befallen, wobei die Vermutung für eine saisonal bedingte Abhängigkeit der Infektionsrate für Ehrlichien berechtigt ist. Die Sequenzierungen zeigten eine 96,0 bis 99,9%-ige Übereinstimmung mit bereits bekannten Sequenzen aus der NCBI-Datenbank.

Da jeweils nur kleine Unterschiede aufgetreten sind, wurden die Sequenzen als in Mitteldeutschland gefundene Variationen in der GenBank angesehen und unter den Accession Nummern: Jena 8: AJ313513, Jena 14: AJ312941, Jena 16: AJ313512, Jena 22: AJ312939, Jena 72: AJ312940, Jena 84: AJ312942 und Jena 238: AJ313511 hinterlegt. Um eine noch genauere Zuordnung zu einzelnen Vertretern der *E. phagocytophila* Gruppe treffen zu können, sollte die Eignung eines anderen Gens mit größerer Mutationsrate im Laufe der Evolution wie z.B. das *groESL* Operon oder das Zitrat-Synthase Gen (*gltA*) geprüft werden.

Anhand anderer Untersuchungen ist auffällig, daß trotz Ehrlichien infizierter Zecken in nahezu allen europäischen Ländern nur verhältnismässig wenige Menschen das klinische Bild einer humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE) entwickeln im Vergleich zu wesentlich häufigerem Auftreten humanpathogener Fälle in Amerika. Eine wichtige Rolle in dieser Frage könnte das *ank* Gen spielen, welches das zytoplasmatische Anka-Protein kodiert mit vermuteter Beeinflussung der Wirtszell-Genexpression. Da die Infektion der Zecken mit Ehrlichien im Ilmtal in dieser Studie nachgewiesen werden konnte, wäre als nächstes die Detektion von Antikörpern im Blut von exponierten Personen aus dem Untersuchungsgebiet bedeutsam, um Informationen über die Humanpathogenität zu erhalten. Man muß allerdings

bedenken, daß die untersuchte Ehrlichieninfektionsrate der Zecken in dieser Arbeit etwa 10-fach geringer ist als die Borrelieninfektionsrate, so daß man auch mit einem geringeren Anteil infizierter Personen rechnen kann.

Dagegen treten Infektionen mit Borrelien auch häufig in Europa auf. Borrelien sind spiralförmige, bewegliche Bakterien aus der Gruppe der Spirochäten. Die Übertragung erfolgt ebenfalls überwiegend durch Zecken, wobei man davon ausgeht, daß die Übertragungswahrscheinlichkeit mit der Dauer des Saugaktes ansteigt, da sich die Erreger im Mitteldarm aufhalten und erst in die Speicheldrüse gelangen müssen. Im Gegensatz zu Ehrlichien ist auch ein transovarieller Weg möglich, so daß bereits die Zecken-Larven infektiös sein können.

*Borrelia burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose, kann aufgrund verschiedener Pathogenitätsmechanismen selbst nach Antibiotika-Therapie im Gewebe persistieren. Die klinische Symptomatik der Lyme-Borreliose wird in drei Stadien eingeteilt, wobei für jedes Stadium bestimmte Leitsymptome charakteristisch sind. Zur Zeit gibt es keine einheitliche Therapieempfehlung. Zum Einsatz kommen für 10 bis 30 Tage Tetracykline, Penizillin G, Zephalosporine, Ampizillin oder Erythromyzin. Ein Verschwinden der klinischen Symptome ist nicht unbedingt mit einer Heilung gleichzusetzen, weshalb längerfristige ärztliche Kontrollen ratsam sind.

Zu dem *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplex rechnet man inzwischen 10 Spezies: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia japonica*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi* und *Borrelia bissettii*. Während *B. afzelii*, *B. garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *Borrelia bissettii* als sicher humanpathogen gelten, ist die Humanpathogenität für *B. valaisiana* noch nicht gesichert.

Die Detektion der Borrelien erfolgte über eine "semi-nested" PCR im OspA Gen, bei der jeweils 3 Primer zum Einsatz kamen, wobei sich die beiden Primer in der Syntheserichtung 5' zu 3' jeweils nur in einem Nukleotid unterschieden, um die Spezies *B. afzelii*, *B. garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto und *B. valaisiana* zu erfassen. Zur Speziesdifferenzierung wurden 5 Restriktionsenzyme in einer RFLP-Analyse verwendet, wobei jedes Enzym nur die OspA-DNA einer bestimmten Spezies schneidet.

Die totale Infektionsrate betrug 11,2% und im einzelnen für Männchen 21,4%, Weibchen 20,6% und Nymphen 8,6%. In jedem der 3 Gebiete wurden Borrelien nachgewiesen, so daß die Verteilung nicht so lokal wie bei den Ehrlichien zu sein scheint. Auffällig war jedoch, daß in Dienstedt kein infiziertes Männchen und insgesamt auch die niedrigste Infektionsrate

gefunden wurde. Analog zur Infektion mit Ehrlichien waren ebenfalls mehr Adulte (21,0%) als Nymphen (8,6%) infiziert.

Eine bereits für das Ilmtal beschriebene saisonale Abhängigkeit der Borrelieninfektionen ließ sich nicht ausreichend bestätigen. Es traten vielmehr zwei Häufigkeitsgipfel auf, je einer im Monat Juli und Oktober.

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, daß eine Borrelienspezies bevorzugt für eine klinische Manifestation beim Menschen verantwortlich ist. Im Restriktionsverdau der insgesamt 34 Borrelien positiven Isolate waren die Spezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in folgender Häufigkeit vertreten: 15 x *B. garinii* (44,1%), 7 x *B. burgdorferi* sensu stricto (32,4%), 6 x *B. afzelii* (17,7%), 2 x *B. valaisiana* (5,9%), sowie 4 x eine Koinfektion mit *B. garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (11,8%).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie erhebt sich die Frage, ob eine mit der am häufigsten nachgewiesenen Spezies *B. garinii* verbundene Neuroborreliose stärker vertreten ist als eine mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto häufig assoziierte Lyme-Athritits oder eine mit *B. afzelii* dominierend auftretende Hautmanifestation der Akrodermatitis chronica atrophicans.

Von den 7 Ehrlichien positiven Zecken war bei 2 Tieren gleichzeitig eine Borrelieninfektion nachweisbar. Die Speziesdifferenzierung ergab in beiden Fällen die Infektion mit der Spezies *B. garinii*, welcher auch insgesamt am häufigsten vorkam. Somit betrug die Koinfektionsrate 0,7% (2 von 305). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Veröffentlichungen anderer Untersuchungen und läßt ein nur zufälliges Auftreten beider Erreger bzw. voneinander unabhängige Infektionsraten vermuten. Die vorliegenden Resultate und die aus veröffentlichten Studien beschriebenen unterliegen bestimmten Einflußgrößen, wie z.B. der Dichte der Zeckenpopulation im Untersuchungsgebiet, der Verteilung der Zecken in der Umwelt, den jährlichen Dichteschwankungen der Nymphen-Populationen oder der schwankenden Infektionsrate mit dem jeweiligen Pathogen. Aber auch die Dichte der Wirtsorganismen für die einzelnen Entwicklungsstadien der Zecken beeinflußt die Prävalenz von Erregern im jeweiligen Gebiet. Der entscheidende Faktor für variable Häufigkeiten der Infektion mit Ehrlichien oder Borrelien konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

Diese Arbeit soll das Wissen über die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern durch Zecken in Deutschland erweitern und dazu beitragen, das Auge der Ärzte für entsprechend häufig auftretende klinische Symptome zu schärfen, aber vielleicht auch Anstoß für weitere klinische Studien im Raum Thüringen sein.

## 7. Anhang

a) Bsp. für ein Alignment des nicht klonierten 151 bp Fragmentes in der NCBI-Datenbank:

▪ **Probe 8:**

Sequenz:

```
TAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGGTCCCG
CAACGAGCGTAACCCCTCGXCCTTA
```

Vergleich in der Genbank:

Bsp.:

gb|AF286699.1|AF286699 *Ehrlichia platys* 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length = 1427

Score = 216 bits (109), Expect = 2e-54  
Identities = 116/117 (99%), Gaps = 1/117 (0%)  
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1 tagatccttcttaacggaagggcgagttcggctggatctcgcacaggtgctgcatggct 60
      |||
Sbjct:941 tagatccttcttaacggaagggcgagttcggctggatctcgcacaggtgctgcatggct 1000
```

```
Query: 61 gtcgtcagctcgtgctgagatggtgggtaagggtcccgcaacgagcgtaaccctc 117
      |||
Sbjct:1001 gtcgtcagctcgtgctgagatggtgggtaa-gtcccgcaacgagcgtaaccctc 1056
```

b) Sequenzerggebnisse der nicht klonierten 151 bp Fragmente der Positivkontrolle und der anderen positiven Proben:

▪ **Positivkontrolle (eines an HGE erkrankten Patienten aus Minnesota):**

```
TCCGTCAGGACTCGCCAGGTGCTCCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTTGCC
AGCGGGTTAAGCCGGGCACTTA
```

▪ **Probe 14:**

```
AGGCTCGTATTGACCCAGACTCGACCTAACATCTTCACAGACACGAGCTG
ACGAACAGTCCATGCAGCACCTGTGCTAGATACCAGCGGAACTCGCCGC
ACCTTCTCGTTAAGAAGGATCTATTCCGTTAAGAAGGATCTAATTTAGAT
CT
```

▪ **Probe 16:**

```
TTCGCACAGGTGCCCGCATGGCTGTGCGTCAGCTACGTGTCGTGAGAAGT
TGGGTTAAGTTCCCCGCATCGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTTGCCAG
```

▪ **Probe 22:**

```
GTTTTCGCACTAGGTGTATAGAGATGTGCTGTGTCAGCTCGTTTCGTGA
GTAAGTTGGGTTACAGTCCCCGCAACGAGCGTCAACCTCTCATGCTTAGTT
GCGCAGCGGAGTTAA
```

▪ **Probe 72:**

```
CGTTGCGGTACTTAACCCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT
GCAGCACCTGTGCGAGAACCAGCCGAACTGCGCCATTCCTTAAGCAAGA
GAT
```

▪ **Probe 84:**

```
TGGTCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATG
TTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTTGCCAGCGG
GTTAAGCCGGGCACTTA
```

▪ **Probe 238:**

```
ACGGCTACGTATGTGGGTACTTAACTCACAACATACTCACGAGCACGAGC
TGACGACAGCCTTGCAGCACCTGTGCGAGTATCCAGCCGTAACCTGTGCAC
ACTTACACAGTATTA
```

**Abb. 7.1:** Sequenzergebnisse der nicht klonierten PCR-Fragmente

In dieser Abbildung ist in a) anhand der Probe 8 ein Beispiel für ein Alignment des nicht klonierten kleinen PCR-Fragmentes dargestellt. Außerdem sind in b) die Sequenzergebnisse der Positivkontrolle und der anderen 6 positiven Proben wiedergegeben. Das Alignment wurde unter der Adresse "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>" angefertigt.

Die obere Reihe, bezeichnet mit "Query", stellt das Resultat der eigenen Sequenzierung dar. Im Vergleich dazu wird in der unteren Reihe, bezeichnet mit "Sbjct", die bereits in der GenBank vorhandene Sequenz veranschaulicht. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Grad der Übereinstimmung mit der ausgewählten Sequenz.

▪ **Positivkontrolle: (eines an HGE erkrankten Patienten aus Minnesota):**

151 bp Fragment: Sequenz KLon 6

```
TAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAGTTCGGCTGGATCTCGCACAGGTG
CTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGCACTT
A
```

943 bp Fragment wurde nicht kloniert

▪ **Probe 8: Jena 8 (Accession No.: AJ313513)**

151 bp Fragment: Plasmidenden ohne Insert fusioniert

943 bp Fragment und nicht kloniertes 151 bp PCR-Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGTAATACTGCATAATCCCTGCC  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAGTGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
CAGTGGGGAATATTGACCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACCGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGA  
GCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTC  
CTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAAGTGGCGAA  
GGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCCTGA  
ATGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCG  
CCTGGGGACTACGGTCCGAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT  
TACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG

⇒ kleines nicht kloniertes Fragment TAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAGT  
TCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG  
GAGATGTTGGGTTAAGGTCCCGCAACGAGCGTAACCTCGTCCCTTA

▪ **Probe 14: Jena 14 (Accession No.:AJ312941)**

943 bp Fragment und 151 bp Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGTAATACTGTATAATCCCTGCC  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAGTGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACCGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGCGGTTCCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGA  
CTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTC  
TAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAAGTGGCGAAG  
GCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCCTGAA  
TGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCG  
CTGGGGACTACGGTCCGAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT  
ACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG

⇒ kleines Fragment TAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAGTT  
CGGCTGAATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTG  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCAACGAGCGTAACCTCATCCTTAGTTGCC  
AGCGGGTTAACGGGCTCTT

▪ **Probe 16: Jena 16 (Accession No.: AJ313412)**

151 bp Fragment: Plasmid fusioniert ohne Insert

943 bp Fragment und nicht kloniertes 151 bp PCR-Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCC  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCATGATGTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAGTGGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCCGC  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCCGC  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGA  
GCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTC  
CTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCTGA  
ATGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCG  
CCTGGGGACTACGGTCCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC  
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCT  
TACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG

⇒ kleines nicht kloniertes Fragment  
AAGGGCGCAGT  
TCGGCTGAATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTTACAGTACGTGTC  
GTGAGAAGTTGGGTTAAGTTCCCGCATCGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGT  
TGCCAG

▪ **Probe 22: Jena 22 (Accession No.: AJ312939)**

943 bp Fragment und 151 bp Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCC  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAGTGGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAAGCTATGCCCGC  
GTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACTCTTTCAGTAGGGAAGATA  
ATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC  
ATGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGG  
ACCTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATT  
CCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTGGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGA  
AGGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG  
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGAGTGTCTG  
AATGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCC  
GCCTGGGGACTACGGTCCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGAC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACC  
TTACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG

⇒ kleines Fragment  
TTAGATCCTTCTTAACGGAAGGGCGCAG  
TTCGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTGTCG  
TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCCTCATCCGTAGTTG  
CCAGCGGGTTAAGCCGGGCACTT

▪ **Probe 72: Jena 72 (Accession No.: AJ312940)**

943 bp Fragment und 151 bp Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCA  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAC TGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACTGTACCTACAGAAGAAGTCCCGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGGCGGTTCCGGTAAAGTTAAAGGTGAAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGA  
ACTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTC  
CTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATAACCGTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTGA  
ATGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTGTAGCTAACGCGTTAAGCATCCG  
CCTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCT  
TACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG  
kleines Fragment **TTAGATCCTTCTTAACGGAAGGT**GCGCAG  
TACGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCG  
TGAGATGTTGGGCTAAGTATCCGCAACGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTT  
GGCAGCGGGTTAAACCGGGCTCTT

▪ **Probe 84: Jena 84 (Accession No.: AJ312942)**

943 bp Fragment und 151 bp Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGCGGGCAATACTGTATACTCCCTGCG  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAC TGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACCGTACCTACAGAAGAAGTCCCGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACAGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGCGGTTCCGGTAAAGTTAAAGGTGAAAATGCCAGGGCTTAACCCCTGGAG  
CTGCTTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTC  
TAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGGATTAGATAACCGTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTGAA  
TGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTGTAGCTAACGCGTTAAGCATCCG  
CTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGACCC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT  
ACCACTCCTTGACATGGAGATTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG  
⇒ kleines Fragment **TTAGATCCTTCTTAACGGAAGGG**GCGCAGTT  
CGGCTGGATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCGT  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGTAACCCCTCATCCTTAGTTGCC  
AGCGGGTTAAGCCGGGCACTT

▪ **Probe 238: Jena 238 (Accession No.: AJ313511)**

943 bp Fragment und 151 bp Fragment zusammengesetzt:

⇒ großes Fragment CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGCTATA  
AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
AGTATGGGATAGCCACTAGAAAATGGTGGGTAATACTGCATAATCCCTGCC  
GGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
GTAGGGTCAAGGCCTACCCAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
GATCAGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGATAA  
TGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCA  
TGTAGCGGTTTCGGTAAAGTTAAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAG  
CTGCTTTTAAACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCC  
TAGTGTAGAGGTGAAATTCGTGGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
GCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGGAGCA  
AACAGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGTCTGAA  
TGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGC  
CTGGGGACTACGGTCCGCAAGACTATAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC  
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTT  
ACCCTCCTTGACATGGAGAT**TAGATCCTTCTTAACGGAAGGG**

⇒ kleines Fragment **TAGATCCTTCTTAACGGAAGGG**CGCAGTT  
CGGCTGGATCTCGCACAGGTGGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC  
CTGCATGGCTGTTCGTGAGCTCTAGTTGCCAGCGGGTTAAGCCGGGCACCT  
AACGAGCGTAACCTCATCCTA

**Abb.7.2.:** Zusammensetzung der klonierten PCR-Fragmente

Diese Abbildung stellt die Sequenzergebnisse der klonierten kleinen und großen PCR-Produkte im Bereich des 16S rRNA Gens und die Zusammensetzung beider Teilbereiche dar, wobei die Überlappungsstelle jeweils hervorgehoben ist. In Probe 72 ist in der Überlappungsstelle ein aufgetretener Basenunterschied von „G“ im großen Fragment und „T“ im kleinen Fragment unterstrichen. Diese Base „G“ lag im Primerbereich (GER3), konnte aber im klonierten großen Fragment eindeutig als „T“ identifiziert werden, weshalb in der zusammengesetzten Sequenz von Jena 72 an dieser Stelle ein „T“ steht.

Von der in der PCR verwendeten Positivkontrolle wurde nur das kleine Fragment kloniert, um die Verbesserung der Resultate im Vergleich zur direkten Sequenzierung (Abb. 7.1.) aufzuzeigen. Bei Probe 8 und Probe 16 ist die Klonierung des kleinen Fragmentes nicht gelungen. Daher wurde das Ergebnis des direkten PCR-Produktes mit der Sequenz des klonierten 943 bp Fragmentes dieser Proben zusammengesetzt. Allerdings sind beide Sequenzen dadurch insgesamt etwas kürzer.

- 5' (→)
- **Anfang: großes Fragment**   
CAAGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGATTATTTCTTTATAGCTTGCTATA  
**Nsi I (ATGCAT)**  
 AAGAATAGTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGT  
 AGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGAGTAATACTGTATAATCCCTGCC  
 (→)
  
  - **Anfang: mittlerer Bereich des großen Fragmentes**   
 GGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTG  
**Bcl I (TGATCA)**  
 GTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGAT  
 GATCAGCCACACTGGAACCTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
**Ssp I (AATATT)**  
 CAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCG  
 TGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACTCTTTTCAGTAGGGAAGATAA  
**Ksp I (CCGCGG)**  
 TGACCGTACCTACAGAAGAAGTCCCGCAAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTCGGAATTATTTGGCGTAAAGGGCA  
 TGTAGCGGTTTCGGTAAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGAG  
**Eco RI (GAATTC)**  
 CTGCTTTTAACTACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAGCGGAATTCC  
**Afl III (ACRYGT)**  
 TAGTGATAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAG  
 GCGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCA  
 AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTGAA  
 (←) **Mlu I (ACGCGT)**
  
  - **Ende: mittlerer Bereich des großen Fragmentes**   
 TGTGGGGATTTTTTATCTCTGTGTTGTAGCTAACGCGTTAAGCACTCCGC  
**Dra II (RGGNCCY)**  
 CTGGGGACTACGGTCGCAAGACTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCC  
 GCACAAGCGGTGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTT  
 (←) (→)
  
  - **Ende: großes und Anfang: kleines Fragment**   
 ACCACTCCTTGACATGGAGATATTAGATCCTTCTTAACCGGAAGGGCGCAGTT  
 CGGCTGAATCTCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG  
 (←) (→)
  
  - **Ende: kleines Fragment**   
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCACAACGAGCGTAACCCTCATCCTTAGTTGCC  
AGCGGGTTAACCGGGCTCTT
- 3'

**Abb. 7.3.:** Vorschlag für die Arbeit mit Restriktionsenzymen im amplifizierten DNA-Abschnitt

Diese Darstellung zeigt eine Auswahl möglicher Restriktionsorte im amplifizierten Bereich des 16S rRNA Gens am Beispiel von Jena 14 (Access. No: AJ312941), wobei diese im Vergleich der 7 Ehrlichien Sequenzen untereinander und mit der HGE Sequenz (Access.No: U02521) aus der NCBI-Datenbank ausgewählt wurden.

Unterstrichen sind jeweils die verwendeten Primersequenzen. Das große Fragment bezeichnet das 943 bp PCR-Produkt mit dem Primerpaar "e16Slarge.fw / e16Slarge.rv und das kleine Fragment das 151 bp PCR-Produkt mit den Primern "GER3 / GER4". Zusätzlich wurden die Primer "erlmitte.fw / erlmitte2.rv" für die Sequenzierung des mittleren Bereiches im großen Fragment verwendet. Die Pfeile

(→) und (←) stehen für die jeweilige DNA-Syntheserichtung in der entsprechenden Primerregion vom 5' zum 3' oder 3' zum 5' Ende. Eingerahmte Sequenzbereiche stellen mögliche Restriktionsstellen innerhalb der Sequenz dar, das entsprechende Enzym ist jeweils mit dem dazugehörigen Restriktionsort in Klammern angegeben. Für den Buchstaben N können die Basen Arginin, Cytosin, Guanin oder Thymin stehen, für R Adenin oder Guanin und für Y Cytosin oder Thymin.

Tab. 7.1. bis Tab. 7.3.:

Die dargestellten Kreuztabellen wurden für die Anwendung des "Fisher exact testes" und für die Abschätzung einer linearen saisonalen Trendentwicklung der Infektionsraten der *Ixodes ricinus* Zecken mit Ehrlichien und Borrelien mit Hilfe des SPSS Programmes Version 10.0 verwendet.

▪ Ehrlichien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
		negativ	positiv	Gesamt	
SEX	Männchen	Anzahl	27	1	28
		% von SEX	96,4%	3,6%	100,0%
	Weibchen	Anzahl	31	3	34
		% von SEX	91,2%	8,8%	100,0%
	Nymphe	Anzahl	240	3	243
		% von SEX	98,8%	1,2%	100,0%
Gesamt		Anzahl	298	7	305
		% von SEX	97,7%	2,3%	100,0%

▪ Borrelien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
		negativ	positiv	Gesamt	
SEX	Männchen	Anzahl	22	6	28
		% von SEX	78,6%	21,4%	100,0%
	Weibchen	Anzahl	27	7	34
		% von SEX	79,4%	20,6%	100,0%
	Nymphe	Anzahl	222	21	243
		% von SEX	91,4%	8,6%	100,0%
Gesamt		Anzahl	271	34	305
		% von SEX	88,9%	11,1%	100,0%

**Tab. 7.1.:**

Kreuztabellen für die Untersuchung der Signifikanzunterschiede der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien in *Ixodes ricinus* Zecken bezüglich des Entwicklungsstadiums.

■ Ehrlichien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
		negativ	positive	Gesamt	
REGION	Bad Berka	Anzahl	141	4	145
		% von REGION	97,2%	2,8%	100,0%
	Belvedere	Anzahl	77	3	80
		% von REGION	96,3%	3,8%	100,0%
	Dienstedt	Anzahl	80		80
		% von REGION	100,0%		100,0%
Gesamt		Anzahl	298	7	305
		% von REGION	97,7%	2,3%	100,0%

■ Borrelien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
		negativ	positiv	Gesamt	
REGION	Bad Berka	Anzahl	126	19	145
		% von REGION	86,9%	13,1%	100,0%
	Belvedere	Anzahl	72	8	80
		% von REGION	90,0%	10,0%	100,0%
	Dienstedt	Anzahl	73	7	80
		% von REGION	91,3%	8,8%	100,0%
Gesamt		Anzahl	271	34	305
		% von REGION	88,9%	11,1%	100,0%

**Tab. 7.2.:**

Kreuztabellen für die Untersuchung der Signifikanzunterschiede der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien in *Ixodes ricinus* Zecken bezüglich der drei Habitate Bad Berka, Belvedere und Dienstedt.

▪ Ehrlichien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
			negativ	positiv	Gesamt
SAISON	Mai/Juni	Anzahl	122	1	123
		% von SAISON	99,2%	,8%	100,0%
	Juli/August	Anzahl	107	2	109
		% von SAISON	98,2%	1,8%	100,0%
	September/Oktober	Anzahl	69	4	73
		% von SAISON	94,5%	5,5%	100,0%
Gesamt		Anzahl	298	7	305
		% von SAISON	97,7%	2,3%	100,0%

▪ Borrelien

**Kreuztabelle**

		ERGEBNIS			
			negativ	positiv	Gesamt
SAISON	Mai/Juni	Anzahl	113	10	123
		% von SAISON	91,9%	8,1%	100,0%
	Juli/August	Anzahl	93	16	109
		% von SAISON	85,3%	14,7%	100,0%
	September/Oktober	Anzahl	65	8	73
		% von SAISON	89,0%	11,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	271	34	305
		% von SAISON	88,9%	11,1%	100,0%

**Tab. 7.3.:**

Kreuztabellen für die Untersuchung der Signifikanzunterschiede der Infektionsraten mit Ehrlichien und Borrelien in *Ixodes ricinus* Zecken bezüglich der saisonalen Entwicklung.

## 8. Literaturverzeichnis

1. **Afzelius, A.** 1910. Verhandlungen der dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm. 16. Dezember 1909. Arch. Dermatol. Syph. (Berlin) **101** (1910):405-406
2. **Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, A. V. Semenov, and C. V. Bolshakov.** 2001. Evidence of ehrlichiosis found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. J. Med. Entomol. **38**:471-474
3. **Alekseev, A. N., H. V. Dubinina, I. van de Pol, and L. M. Schouls.** 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in the Baltic regions of Russia. J. Clin. Microbiol. **39**:2237-2242
4. **Alberdi, M. B., A. R. Walker, E. A. Paxton, and K. J. Sumption.** 1998. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. Vet. Parasit. **78**:203-213
5. **Anderson, B. E., J. E. Dawson, D. C. Jones, and K. H. Wilson.** 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **29**:2838-2842
6. **Anderson, B. E., K. G. Sims, J. G. Olson, J. E. Childs, J. E. Piesmann, C. M. Happ, G. O. Maupin, and B. J. B. Johnson.** 1993. *Amblyoma americanum*: a potential vector of human ehrlichiosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. **49**:239-244
7. **Anderson, J. F., C. J. Russel, L. A. Magnarelli, and F. W. Hyde.** 1985. Identification of endemic foci of Lyme disease: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks. J. Clin. Microbiol. **22**:36-38
8. **Anthonissen, F. M., M. De Kessel, P. P. Hoet, and G. H. Bigaignon.** 1994. Evidence for the involvement of different genospecies of *Borrelia* in the clinical outcome of Lyme disease in Belgium. Res. Microbiol. **145**:327-331
9. **Bakken J. S., and J. S. Dumler.** 2001. Proper nomenclature for the human granulocytic ehrlichiosis agent. Emerg. Infect. Dis. **7**(3): 486
10. **Bakken, J. S., J. S. Dumler, S. M. Chen, M. R. Eckman, L. L. Van Etta, and D. H. Walker.** 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. JAMA **272**:212-218
11. **Bakken, J. S., J. Krueth, C. Wilson-Nordskog, R. L. Tilden, K. Asanovic, and J. S. Dumler.** 1996. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. JAMA **275**:199-205
12. **Balmelli, T., and J. C. Pfiffaretti.** 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Res: Microbiol. **146**:329-340
13. **Bannwarth, A.** 1941. Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Ein Beitrag zum Problem "Allergie und Nervensystem" in zwei Teilen. Arch. Psychiatr. Nervenkr. **113**:284-376
14. **Barlough, J. E., J. E. Madigan, E. DeRock, J. S. Dumler, and J. S. Bakken.** 1995. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic ehrlichia (HGE agent). J. Clin. Microbiol. **33**:3333-3334
15. **Barlough, J. E., J. E. Madigan, D. R. Turoff, J. R. Clover, J. M. Shelley, and J. S. Dumler.** 1997. An *Ehrlichia* strain from llama (*Llama glama*) and llama-associated ticks (*Ixodes pacificus*). J. Clin. Microbiol. **35**:1005-1007

16. **Barlough, J. E., J. E. Madigan, E. DeRock, and L. Bigornia.** 1996. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). *Vet. Parasit.* **63**:319-329
17. **Barton, L. L., J. E. Dawson, G. W. Letson, A. Luisiri, and A. J. Scalzo.** 1990. Simultaneous ehrlichiosis and Lyme disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**:127-129
18. **Baumgarten, B. U., M. Röllinghoff, and C. Bogdan.** 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from Southern Germany. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3348-3451
19. **Baumgarten, B. U., M. Röllinghoff, and C. Bogdan.** 2000. Ehrlichien Durch Zecken übertragbare Erreger. *Deutsches Ärzteblatt* **38**:1857-1863
20. **Bäverstedt, B.** 1943. Lymphadenosis benigna cutis. Eine klinische und pathologisch-anatomische Studie. *Acta Derm. Venereol.* **24**:1-102
21. **Bäverstedt, B.** 1950. Lymphadenosis benigna cutis (LABC): Its nature, course and prognosis. *Acta Derm. Venereol. (Stockh)* **40**:10-18
22. **Bennett, C. E.** 1995. Ticks and Lyme disease. *Adv. Parasitol.* **36**:343-405
23. **bgvv.** 1997. Krankheitsüberträger Zecke. Deutsches Grünes Kreuz
24. **Brayton, K. A., D. P. Knowles, T. C. McGuire, and G. H. Palmer.** 2001. Efficient use of small genome to generate antigenic diversity in tick-borne ehrlichia pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:4130-4135
25. **Brouqui, P., J. S. Dumler, R. Lienhard, M. Brossard, and D. Raoult.** 1995. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Lancet* **346**: 782-783
26. **Brouqui, P., E. Salvo, J. S. Dumler, and D. Raoult.** 2001. Diagnosis of granulocytic ehrlichiosis in humans by Immunofluorescence Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**:199-202
27. **Burgdorfer, W.** 1986. Discovery of the Lyme disease spirochete: A historical review. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A* **263**:7-10
28. **Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis.** 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**:1317-1319
29. **Burgdorfer, W., F. H. Stanley, and D. Corwin.** 1989. Pathophysiology of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Ixodid ticks. *Rev. Infect. Dis.* **11**:442-445
30. **Büscher, G., R. Gandras, G. Apel, and K. T. Friedhoff.** 1984. Der erste Fall von Ehrlichiosis beim Pferd in Deutschland. *Dtsch. tierärztl. Wschr.* **91**:408-409
31. **Caturegli, P., K. M. Asanovich, J. J. Walls, J. S. Bakken, J. E. Madigan, V. L. Popov, and J. S. Dumler.** 2000. *ankA*: an *Ehrlichia phagocytophila* group gene encoding a cytoplasmatic protein antigen with ankyrin repeats. *Infect. Immun.* **68**: 5277-5283
32. **Cao, W. C., Q. M. Zhao, P. H. Zhang, J. S. Dumler, X. T. Zhang, L. Q. and Fang, H. Yang.** 2000. Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4208-4210
33. **Carter, S. E., M. D. Ravyn, Y. Xu, and R. C. Johnson.** 2001. Molecular typing of the etiologic agent of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3398-3401

34. **Chae, J. S., J. E. Foley, J. S. Dumler, and J. E. Madigan.** 2000. Comparison of the nucleotide sequences of 16S rRNA, 444 *Ep*-ank and *groESL* heat shock operon genes in naturally occurring *Ehrlichia equi* and human granulocytic Ehrlichiosis agent isolates from Northern California. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1364-1369
35. **Chen, S. M., J. S. Dumler, J. S. Bakken, and D. H. Walker.** 1994. Identification of a granulocytic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 3365-3366
36. **Christen, H. J., D. Delekat, D. Rating, und vF. Hanefeld.** 1985. Erythema-Migrans-Krankheit. Drei Fallbeispiele mit neurologischen Komplikationen. *Mschr. Kinderheilk.* **133**:732-737
37. **Cinco, M., D. Padovan, R. Murgia, M. Maroli, L. Frusteri, M. Heldtander, K. E. Johansson, and E. Olsson Engvall.** 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **35**:3365-3366
38. **Cinco, M., D. Padovan, R. Murgia, M. Heldtander, and E. Olsson Engvall.** 1998. Detection of HGE agent like *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks in Northern Italy by PCR. *Wien Klin. Wochenschr.* **110**:898-900
39. **Èižman, M., T. Avšič -Županc, M. Petrovec, E. Ružič -Sabljč, and M. Pokorn.** 2000. Seroprevalence of ehrlichiosis, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis infections in children and young adults in Slovenia. *Wien Klin. Wochenschr.* **112/19**:842-845
40. **Cornely, M., and U. Schultz.** 1992. Zur Zeckenfauna Ostdeutschlands. *Angew. Parasitol.* **33**:173-183
41. **Craft, J. E., D. K. Fisher, G. T. Shimamoto, and A. C. Steere.** 1986. Antigens of *Borrelia burgdorferi* recognized during Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **78**:934-939
42. **Damaerschallck, I., A. Benmessaoud, M. De Kesel, B. Hoyois, Y. Lobet, P. Hoet, G. Bigaignon, A. Bollen, and E. Godfroid.** 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**:602-608
43. **Daniels, T. J., T. M. Boccia, S. Varde, J. Marcus, J. Le, D. J. Bucher, R. C. Falco, and I. Schwartz.** 1998. Geographic risk for lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in Southern New York State. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4463-4469
44. **Dawson J. E., B. E. Anderson, D. B. Fishbein, J. L. Sanchez, C. S. Goldsmith, K. H. Wilson, et al.** 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *J. Clin Microbiol.* **29**:2741-2745
45. **De-Martino, S. J., J. A. Carlyon, and E. Fikrig.** 2001. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* **345**:151-152
46. **Dobbenburgh van, A, A. P. van Dam, and E. Fikrig.** 1999. Human granulocytic ehrlichiosis in western Europe. *N. Eng. J. Med.* **340**:1214-1215
47. **Donatien, A., and F. Lestoquard.** 1935. Existence en Algérie d'une rickettsia du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **28**:418-419
48. **Dorn, W., S. Messutat, S. Kipp, A. Feldmann, and U. Sünder.** 1999. Seasonal variations in the infestation of rodents with *Ixodes ricinus* Linnaeus (Acari: Ixodidae) and prevalence of *Borrelia* infections in a habitat of the Ilm-Valley (Thuringia, Germany). *Zentbl. Bakteriologie.* **289**:696-697

49. **Dubinín, V. B.** 1948. The role of animal's migration in the diseases' dissemination. Proc. Kazak. Acad. Sci. **5**:13-23
50. **Duffy, J., M. R. Pittlekow, C. P. Kolbert, B. J. Ritledge, and D. H. Persing.** 1997. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of HGE [letter]. Lancet:394-399
51. **Duray, P. H., and A. C. Steere.** 1986. The spectrum of organ and systems pathology in human Lyme disease. Zentbl. Bakteriол. Hyg. A **263**:169-178
52. **Eng, T. R., J. R. Harkess, D. B. Fishbein, J. E. Dawson, C. N. Greene, M. A. Redus, and F. T. Satalowich.** 1990. Epidemiologic, clinical, and laboratory findings of human ehrlichiosis in the United States, 1988. J. Med. Assoc. **264**:2251-2258
53. **Eng, T. R., L. M. Wilson, A. Spielman, and C. C. Lastavica.** 1988. Greater risk of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs than in people. J. Infect. Dis. **158**:1410-1411
54. **Estrada-Peña, A., M. Daniel, F. Frandsen, L. Gern, G. Gettinby, J. S. Gray, T. G. T. Jaenson, F. Jongejan, O. Kahl, E. Korenberg, R. Mehl, and P. A. Nuttall.** 1998. *Ixodes ricinus* strains in Europe. Zentbl. Bakteriол. **287**:185-189
55. **Fingerle, V., H. Bergmeister, G. Liegl, E. Vanek, and B. Wilske.** 1994. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* in Southern Germany. J. Spiroch. Tick-borne Dis. **1**: 41-45
56. **Fingerle, V., J. L. Goodmann, R. C. Johnson, T. J. Kurtti, U. G. Munderloh, and B. Wilske.** 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in Southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. J. Clin. Microbiol. **35**: 3244-3247
57. **Fingerle, V., H. Laux, U. G. Munderloh, U. Schulte-Spechtel, and B. Wilske.** 2000. Differential expression of outer surface protein A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. Med. Microbiol. Immunol. (Berlin) **189**:59-66
58. **Fingerle, V., G. Liegl, U. G. Munderloh, and B. Wilske.** 1998. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. Med. Microbiol. Immunol. **187**:121-126
59. **Fingerle, V., U. G. Munderloh, G. Liegl, and B. Wilske.** 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. Med. Microbiol. Immunol. **188**:145-149
60. **Fishbein, D. B., J. E. Dawson, and L. E. Robinson.** 1994. Human ehrlichiosis in the United States, 1985-1990. Ann. intern. Med. **120**:736-743
61. **Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, and P. Jurtshuk.** 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. J. Syst. Bacteriol. **42**:166-170
62. **Fritz, C. L., and C. A. Glaser.** 1998. Ehrlichiosis. Infect. Dis. Clin. North. Am. **12**:123-136
63. **Garin, C., and C. H. Bujadoux.** 1922. Paralyse par les tiques. J. Med. Lyon **71**:765-767
64. **Gern, L., A. Estrada-Peña, F. Frandsen, J. A. Gray, T. G. T. Jaenson, F. Jongejan, O. Kahl, E. Korenberg, R. Mehl, P. A. Nuttall.** 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zentbl. Bakteriол. **287**:196-204
65. **Gern, L., and P. F. Humair.** 1998. Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Wien Klin. Wochenschr. **110/24**:856-858

66. **Gern, L., C. Min Hu, E. Kocianova, V. Vyrostekova, and J. Rehacek.** 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *European J. Epidem.* **15**:665-669
67. **Gern, L., and O. Rais.** 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **33**:189-192
68. **Gershel, J. C.** 2000. Human granulocytic ehrlichiosis presenting as abdominal pain. *Pediatrics* **106**:602-604
69. **Gilmore, R. D., M. L. Mbow, and B. Stevenson.** 2001. Analysis of *Borrelia burgdorferi* during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microbes. Infect.* **3**:799-808
70. **Goodmann, J. L., C. Nelson, B. Vitale, J. E. Madigan, J. S. Dumler, T. J. Kurtti, and U. G. Munderloh.** 1996. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *The N. Eng. J. Med.* **334**:209-215
71. **Gordon, W. S., A. Brownlee, D. R. Wilson, and J. Macleod.** 1932. Tick-borne fever, a hitherto undescribed disease of sheep. *J. comp. Path. Ther.* **45**:301-306
72. **Gray, J. S.,** 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*, a vector of Lyme borreliosis. *Rev. Med. Vet. Entomol.* **79**:323
73. **Grübner, I., W. Dorn, and H. J. Mentzel.** 1999. Children's borreliosis in Thuringia. *Zentbl. Bakteriol.* **289**:725-729
74. **Gylfe, A., S. Bergstrom, J. Lunstrom, and B. Olsen.** 2000. Reactivation of *Borrelia burgdorferi* in birds. *Nature (Lond.)* **403**:724-725
75. **Guy, E., S. Tasker, and D. H. M. Joynson.** 1998. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in UK ticks using polymerase chain reaction. *Epidemiol. Infect.* **121**:681-683
76. **Harkess, J. R.** 1989. Ehrlichiosis: a cause of bone marrow hypoplasia in humans. *Am. J. Hematol.* **30**:265-266
77. **Hartelt, K., R. Oehme, S. Moll, and P. Kimmig.** 2001. Epidemiology of ehrlichiosis in Baden-Wuerttemberg. *Infection* **29**:51
78. **Heimer, R., A. van Andel, G. P. Wormser, and M. L. Wilson.** 1997. Propagation of granulocytic *Ehrlichia* spp. from human and equine sources in HI-60 cells induced to differentiate into functional granulocytes. *J. Clin. Microbiol.* **35**:923-927
79. **Hellerström, S.** 1930. Erythema chronicum migrans Afzelii. *Acta Derm. Venereol.* **11**:315-321
80. **Herxheimer, K., and K. Hartmann.** 1902. Über Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch. Dermatol. Syph. (Berlin)* **61**:57-76
81. **Hodzic, E., D. Fish, C. M. Marezki, A. M. de Silva, S. Feng, and S. W. Barthold.** 1998. Acquisition and transmission of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **36**:3574-3578
82. **Hu, C. M., B. Wilske, V. Fingerle, Y. Lobet, and L. Gern.** 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA Serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1169-1171
83. **Hubálek, Z., and J. Halouzka.** 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* **13**:951-957

84. **Hubálek, Z., J. Halouzka, Z. Juřicova, and Š. Svobodová.** 1994. Seasonal distribution of Borreliae in *Ixodes ricinus* ticks. Zentbl. Bakteriolog. **280**:423-431
85. **Hubálek, Z., E. I. Korenberg, et al.** 1990. Prevalence of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks from Southern Moravia, Czechoslovakia. Folia Parasitol. **37**:359-362
86. **Hunfeld, K. P., and V. Brade.** 1999. Prevalence of antibodies against the human granulocytic ehrlichiosis agent in Lyme borreliosis patients from Germany. Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **18**:221-224
87. **Hyde, F. W., and R. C. Johnson.** 1986. Genetic analysis of Borrelia. Zentbl. Bakteriolog. Hyg. A **263**:119-122
88. **Inokuma, H., P. Brouqui, M. Drancourt, and D. Raoult.** 2001. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of Ehrlichia. J. Clin. Microbiol. **39**:3031-3039
89. **Inokuma, H., P. Parola, D. Raoult, and P. Brouqui.** 2001. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi Prefecture, Japan. Vet. Parasit. **99**:335-339
90. **Jaulhac, B., R. Heller, F. X. Limbach, Y. Hausmann, D. Lipsker, H. Monteil, J. Sibilia, and Y. Piémont.** 2000. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with Lyme arthritis. J. Clin. Microbiol. **38**:1895-1900
91. **Jauris-Heipke, S., G. Liegl, V. Praec-Mursic, D. Rössler, E. Schwab, E. Soutschek, G. Will, and B. Wilske.** 1995. Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to *ospA* genotype and evidence of lateral gene exchange of *ospC*. J. Clin. Microbiol. **33**:1860-1866
92. **Jenkins, A., B. E. Kristiansen, A. G. Allum, R. K. Aarke, L. Strand, E. J. Kleveland, and I. van de Pol, L. Schouls.** 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. J. Clin. Microbiol. **39**:3666-3671
93. **Junttila, J., M. Peltomaa, H. Soini, M. Marjamäki, and M. Viljanen.** 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. J. Clin. Microbiol. **37**:1361-1365
94. **Kahl, O., and W. Knülle.** 1988. Wirtssuchaktivität der Schildzecke *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) und ihre Durchseuchung mit Lyme-Spirochäten und dem Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)-Virus in Berlin (West). Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent. **6**:223-225
95. **Kahl, O., K. Schmidt, A. Schönberg, U. Laukamm-Josten, W. Knülle, and U. Bienzle.** 1989. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West). Zentbl. Bakteriolog. Hyg. A **270**:434-440
96. **Karlsson, U., A. Bjoersdorff, R. F. Massung, and B. Christensson.** 2001. Human granulocytic ehrlichiosis—a clinical case in Scandinavia. Scand. J. Infect. Dis. **33**:73-74
97. **Kirstein, F., S. G. Rijpkema, M. Molkenboer, and J. S. Gray.** 1997. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. Appl. Environ. Microbiol. **63**:1102-1106
98. **Kirstein, F., S. Rijpkema, M. Mokenboer, and J. S. Gray.** 1997. The distribution and prevalence of *B. burgdorferi* genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Ireland. Eur. J. Epidemiol. **13**:67-72
99. **Körting, H. J., K. Senkpiel, and G. Reichel.** 1988. Bakterielle und virale Infektionen nach Zeckenbiß. Z. Klin. Med. **43**:149-153

100. **Krampitz, H. E., and S. Bark.** 1987. Zur Epidemiologie der Ixodes-Borreliose in Süddeutschland. *Immun. Infect.* **15**:141-145
101. **Kurtenbach, K., M. Peacey, S. G. T. Rijpkema, A. N. Hoodless, P. A. Nuttall, and S. E. Randolph.** 1998. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1169-1174
102. **Lepidi, H., J. E. Bunnell, M. E. Martin, J. E. Madigan, S. Stuen, and J. S. Dumler.** 2000. Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**:1, 29-37
103. **Leuba-Garcia, S., M. D. Kramer, R. Wallich, and L. Gern.** 1994. Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Zentbl. Bakteriol.* **180**:468-475
104. **Leutenegger, C. M., N. Pusterla, C. N. Mislin, R. Weber, and H. Lutz.** 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3390-3391
105. **Levin, M. L., and D. Fish.** 1999. Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. *Infect. Immun.* **68**: 2183-2186
106. **Lin, T., J. H. Jr. Oliver, L. Gao, T. M. Jr. Kollars, and K. L. Clark.** 2001. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern United States based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2500-2507
107. **Liveris, D., A. Gazumyan, and I. Schwartz.** 1995. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* **33**:589-595
108. **Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, T. Avsic-Zupane, W. L. Nicholson, J. W. Sumner, J. E. Childs, and F. Strle.** 1998. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe: clinical and laboratory findings in four patients from Slovenia. *Clin. Infect. Dis.* **27**:424-428
109. **Lotric-Furlan, S., M. Petrovec, T. Avsic-Zupane, W. L. Nicholson, J. W. Sumner, J. E. Childs, and F. Strle.** 1998. Human ehrlichiosis in central Europe. *Wien Klin. Wochenschr.* **110**:894-897
110. **Lünemann, J. D., S. Zarmas, S. Priem, J. Franz, R. Zschenderlein, E. Aberer, R. Klein, L. Schouls, G. R. Burmeister, and A. Krause.** 2001. Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species from patients with different manifestations of lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1130-1133
111. **Madigan, J. E., J. E. Barlough, J. S. Dumler, N. S. Schankman, and E. DeRock.** 1996. Equine granulocytic ehrlichiosis in Connecticut caused by an agent resembling the human granulocytotropic ehrlichia. *J. Clin. Microbiol.* **34**:434-435
112. **Madigan, J. E., D. V. M., M. S., and N. Pusterla.** 2000. Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **16**(3): 487-99
113. **Magnarelli, L. A., T. G. Andreadis, K. C. Stafford III, and C. J. Holland.** 1991. Rickettsiae and *Borrelia burgdorferi* in ixodid ticks. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2798-2804
114. **Magnarelli, L. A., J. S. Dumler, J. F. Anderson, R. C. Johnson, and E. F. Fikrig.** 1995. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3054-3057

115. **Magnarelli, L. A., K. C. Stafford III., T. N. Mather, M. T. Yeh, K. D. Horn, and J. S. Dumler.** 1995. Hemolytic Rickettsia-like organisms in ticks: serologic reactivity with antisera to Ehrlichiae and detection of DNA of agent of human granulocytic ehrlichiosis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2710-2714
116. **Maiwald, M., R. Oehme, O. March, T. N. Petney, P. Kimmig, K. Naser, H. Zappe, D. Hassler, and M. von Knebel Doeberitz.** 1998. Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. *Epidemiol. Infect.* **121**:103-108
117. **Marconi, R. T., S. Hohenberger, S. Jauris-Heipke, U. Sxhulte-Spechtel, C. P. La Voie, D. Rößler, and B. Wilske.** 1999. Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3965-3970
118. **Martino, S. J., J. A. Carlyon, and E. Fikrig.** 2001. Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Eng. J. Med.* **345**:150-151
119. **Massung, R. F., K. Slater, J. H. Owens, W. L. Nicholson, T. N. Mather, V. B. Solberg, and J. G. Olson.** 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1090-1095
120. **Massung, R. F., J. H. Owens, D. Ross, K. D. Reed, M. Petrovec, A. Bjoersdorff, R. T. Coughlin, G. A. Beltz, and C. I. Murphy.** 2000. Sequence analysis of the *ank* gene of granulocytic Ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **38** (8): 2917-2922
121. **Matuschka, F. R., A. Ohlenbusch, H. Eiffert, D. Richter, and A. Spielman.** 1996. Characteristics of Lyme disease spirochetes in archived European ticks. *J. Infect. Dis.* **174**:424-426
122. **Mauel, M. J., S. J. Carlton, and T. N. Mather.** 1999. Polymerase chain reaction detection efficiency of the human granulocytic ehrlichiosis agent (Rickettsiaceae) in ticks (Acari: Ixodidae) is dependent on the DNA Extraction method. *J. Med. Entomol.* **36** (6):649-652
123. **Mejlon, H. A., and T. G. T. Jaenson.** 1993. Seasonal prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in different vegetation types in Sweden. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**:449-456
124. **Misao, T., and Y. Kobayashi.** 1955. Studies on infectious mononucleosis (glandular fever). I. Isolation of etiologic agent from blood, bone marrow and lymph node of a patient with infectious mononucleosis by using mice. *Kyushu J. Med. Sci.* **6**:145-152
125. **Misonne, M. C., and P. P. Hoet.** 1998. Species-specific plasmid sequences for PCR identification of the three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involved in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **36**:269-272
126. **Mitchell, P. D., K. D. Reed, and J. M. Hofkes.** 1996. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. *J. Clin. Microbiol.* **34**:724-727
127. **Mommert, S., R. Gutzmer, A. Kapp, and T. Werfel.** 2001. Sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA and differentiation of *Borrelia* species by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2663-2667
128. **Monteil, H., B. Jaulhac, and Y. Piémont.** 1989. Lyme disease and *Borrelia burgdorferi* infections in Europe. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* **47**:428-437
129. **Morais, J. D., J. E. Dawson, C. Greene, A. R. Filipe, L. C. Galhardas, and F. Bacellar.** 1991. First European case of ehrlichiosis. *Lancet* **338**:633-634
130. **Mott, J., and Y. Rikihisa.** 2000. Human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits superoxide anion generation by human neutrophils. *Infect. Immun.* **68**:6697-6703

131. **Munderloh, U. G., J. E. Madigan, J. S. Dumler, J. L. Goodman, S. F. Hayes, J. E. Barlough, C. M. Nelson, and T. J. Kurtti.** 1996. Isolation of the equine granulocytic ehrlichiosis agent, *Ehrlichia equi*, in tick cell culture. *J. Clin. Microbiol.* **34**:664-670
132. **Munderloh, U. G., and T. J. Kurtti.** 1989. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp. Appl. Acarol.* **7**:219-229
133. **Murphy, C. I., J. R. Storey, J. Recchia, L. A. Doros-Richert, C. Gingrich-Baker, K. Munroe, J. S. Bakken, R. T. Coughlin, and G. A. Beltz.** 1998. Major antigenic proteins of the agent of human granulocytic ehrlichiosis are encoded by members of a multigene family. *Infect. Immun.* **66**:3711-3718
134. **Nadelmann, R. D., J. Nowakowski, and G. P. Wormser.** 1993. Can Lyme borreliosis be prevented after tick bite? *Lancet* **342**:1052
135. **Nadelman, R. B., H. W. Horowitz, T. C. Hsieh, J. W. Wu, M. E. Aguero-Rodenfeld, I. Schwartz, J. Nowakowski, S. Varde, and G. P. Wormser.** 1997. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N. Engl. J. Med.* **337**: 27-30
136. **Negrobov, V. P., and V. S. C. Borodin.** 1964. Einige seltene Zeckenfunde im mittleren Teil der DDR. *Angew. Parasitol.* **5**:107-111
137. **Nohlmans, L. M. K. E., R. de Boer, and A. E. J. M. van den Bogaard.** 1995. Genotypic and phenotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **33**:119-125
138. **Nutt, A. K., and J. P. Raufmann.** 1998. Gastrointestinal and hepatic manifestations of human ehrlichiosis: 8 cases and a review of the literature. *Rev. Art.* **17**:37-43
139. **Nuttall, P. A., G. C. Paesen, C. H. Lawrie, and H. Wang.** 2000. Vector-host interactions in disease transmission. *J. Mol. Microbiol. Biotech.* **2**:4, 381-386
140. **O'Connell, S., M. Granström, J. S. Gray, and G. Stanek.** 1998. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentbl. Bakteriol.* **287**:229-240
141. **Ogdgen, N. H., Z. Woldehiwet, and C. A. Hart.** 1998. Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* **47**: 475-482
142. **Oteo, J. A., J. R. Blanco, V. Martinez de Artola, and V. Ibarra.** 2000. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). *Emerg. Infect. Dis.* **6**:430-432
143. **Ott, A., and A. Schönberg.** 1988. Erste kulturelle Anzüchtung von *Borrelia burgdorferi* aus der Hautprobe einer Patientin mit Erythema migrans in Berlin. *Deutsches Ärzteblatt* **50**:C-2187-2188
144. **Pancholi, P., C. P. Kolbert, P. D. Mitchell, K. D. Reed, S. J. Dumler, J. S. Bakken, S. R. Telfort III., and D. H. Persing.** 1995. *Ixodes dammini* (*scapularis*) as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J. Infect. Dis.* **172**: 1007-1012
145. **Paul, H., H. J. Gerth, and R. Ackermann.** 1986. Infectiousness for humans of *Ixodes ricinus* containing *Borrelia burgdorferi*. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A* **263**:473-476
146. **Péter, O., and A. G. Bretz.** 1992. Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zentbl. Bakteriol.* **277**:28-33
147. **Petersen, L. R., L. A. Sawyer, D. B. Fishbein, P. W. Kelley, R. J. Thomas, L. A. Magnarelli, M. Redus, and J. E. Dawson.** 1989. An outbreak of ehrlichiosis in members of an army reserveunit exposed to ticks. *J. Infect. Dis.* **159**:562-568

148. **Petrovec, M., S. L. Furlan, T. A. Zupang, F. Strle, P. Brouqui, V. Roux, and J. S. Dumler.** 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1556-1559
149. **Petrovec, M., Sumner J. W., W. L. Nicholson, J. E. Childs, F. Strle, J. Barliè, S. Lotriè-Furlan, T. Avšič-Županc.** 1999. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *J. Clin. Microbiol.* **37**:209-210
150. **Pichon, B., E. Godfroid, B. Hoyois, A. Bollen, F. Rodhain, and C. Pérez-Eid.** 1995. Simultaneous infection of *Ixodes ricinus* nymphs by two *Borrelia burgdorferi* sensu lato species: possible implications for clinical manifestations. *Emerg. Infect. Dis.* **1**:89-90
151. **Pick, N., I. Potsman, C. Strenger, A. Keysary, and I. Schwartz.** 2000. Ehrlichiosis associated vasculitis. *J. Int. Med.* **247**:674-678
152. **Pierard, D., E. Levtschenko, J. E. Dawson, and S. Lauwers.** 1995. Ehrlichiosis in Belgium. *Lancet* **346**:1233-1234
153. **Poland, G. A., and R. M. Jacobson.** 2001. The prevention of Lyme disease with vaccine. *Vaccine* **19**:2303-2308
154. **Praec-Mursic, V., B. Wilske, and G. Schierz.** 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks, culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A* **263**:112-118
155. **Pusterla, N., U. Braun, C. M. Leutenegger, C. Reusch, and H. Lutz.** 2000. Ehrlichiose in der Schweiz-Bedeutung für die Veterinärmedizin. *Schweiz-Arch.-Tierheilkd.* **142**: 367-73
156. **Pusterla, N., J. B. Huder, C. M. Letenegger, U. Braun, J. E. Madigan, and H. Lutz.** 1999. Quantitative real-time-PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1329-1331
157. **Pusterla, N., C. M. Leutenegger, J. B. Huder, R. Weber, U. Braun, and H. Lutz.** 1999. Evidence of the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1332-1334
158. **Randolph, S. E., L. Gern, and P. A. Nuttall.** 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today* **12**:472-479
159. **Regnery, R. L., C. L. Spruill, and B. D. Plikaytis.** 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* **173**:1576-1589
160. **Rijpkema, S., D. Golubic, M. Molkenboer, N. Verbeek De Kruif, and J. Schellekens.** 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**:23-30
161. **Rijpkema, S., J. Nieuwenhuijs, F. F. Franssen, and F. Jongejan.** 1994. Infection rates of *Borrelia burgdorferi* in different instars of *Ixodes ricinus* ticks from the Dutch North Sea Island of Ameland. *Exp. Appl. Acarol.* **18**:531-542
162. **Rijpkema, S. G. T., D. T. Tazelaar, M. J. C. H. Molkenboer, G. T. Noordhoek, G. Plantiga, L. M. Shouls, and J. F. P. Schellekens.** 1996. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR inn skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**:109-116

163. **Rikihisa, Y.** 1991. The tribe *Ehrlichieae* and Ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**: 286-308
164. **rki.** 2000 / 2001. Aktuelle Informationen über Ehrlichien und Borrelien des Robert-Koch-Institutes. "http://www.rki.de"
165. **Robert-Koch-Institut.** 2001. Risikofaktoren für Lyme-Borreliose: Ergebnisse einer Studie in einem Brandenburger Landkreis. *Epidemiologisches Bulletin* **21**:147-149
166. **Rosa, P. A., D. Hogan, and T. G. Schwan.** 1991. Polymerase chain reaction analysis identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **29**:524-532
167. **Roux, V., E. Rydkina, M. Ereemeeva, and D. Raoult.** 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:252-261
168. **Rynkiewicz, D., and L. X. Liu.** 1994. Human ehrlichiosis in New England. *N. Engl. J. Med.* **330**:292-293
169. **Saint Girons, I., L. Gern, E. C. Gray, E. Korenberg, P. A. Nuttall, S. G. T. Rijpkema, A. Schönberg, G. Stanek, and D. Postic.** 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentbl. Bakteriologie* **287**:190-195
170. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. E. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> edn. Gold Spring Harbor, New York
171. **Santino, I., A. Iori, R. Sessa, C. Sulli, G. Favia, and M. Del Piano.** 1998. *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Ehrlichia chafeensis* in the National Park of Abruzzo. *FEMS Microbiology letters* **164**:1-6
172. **Schmid, G. P.** 1985. The global distribution of Lyme disease. *Rev. Infect. Dis.* **7**:41-50
173. **Schönberg, A., C. Camey, O. Kahl, B. Wilske, V. Preac-Mursic, and K. Hovind-Hougen.** 1988. First isolation of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme Borreliosis, from *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) in Berlin (West). *Zentbl. Bakteriologie Hyg. A* **268**:487-497
174. **Schönberg, A., W. Erler, and B. Jacob.** 1996. Vergleichende Untersuchungen von *Borrelia-burgdorferi*-Isolaten aus dem Berliner Raum als Beitrag zur serologischen Diagnostik. *Bundesgesundheitsblatt Sonderdruck* **9**:331-336
175. **Schouls, L. M., I. van de Pol, S. G. T. Rijpkema, and C. S. Schot.** 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**:2215-2222
176. **Schwartz, I., D. Fish, and T. J. Daniels.** 1997. Prevalence of the rickettsial agent of human granulocytic ehrlichiosis in ticks from a hyperendemic focus of Lyme disease. *N. Eng. J. Med.* **337**:49-50
177. **Shrestha, M., R. L. Grodzicki, and A. C. Steere.** 1985. Diagnosing early Lyme disease. *Am. J. Med.* **78**:235-240
178. **Shapiro, E. D.** 2001. Doxycycline for tick bites-not for everyone. *N. Engl. J. Med.* **345**:133-134
179. **Sparagano, O. A. E., M. T. E. P. Allsopp, R. A. Mank, S. G. T. Rijpkema, J. V. Figueroa, and F. Jongejan.** 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp. Appl. Acarol.* **23(12)**: 929-60
180. **Ståhlhammar-Carlemalm, M., E. Jenny, L. Gern, A. Aeschlimann, and J. Meyer.** 1990. Plasmid analysis and restriction fragment length polymorphism of chromosomal DNA allow distinction between *Borrelia burgdorferi* strains. *Zentbl. Bakteriologie* **274**:28-39
181. **Stanek, G., I. Burger, A. Hirschl, G. Wewalka, and A. Radda.** 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. *Zentbl. Bakteriologie Hyg. A* **263**:29-33

182. **Stanek, G., M. Pletschette, H. Flamm, A. M. Hirschl, E. Aberer, W. Kristoferitsch, and E. Schmutzhard.** 1988. European Lyme Borreliosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **539**:274-282
183. **Stedingk, L. V. von, M. Gürtelschmid, H. S. Hanson, R. Gustafson, I. Dotevall, E. Olsson Engvall, and M. Granstrom.** 1997. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in Swedish ticks. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**: 573-574
184. **Steere, A. C., N. H. Bartenhagen, J. E. craft, G. J. Hutchinson, J. H. N.man, A. R. Pachner, D. W. Rahn, L. H. Sigal, E. Taylor, and S. E. Malawista.** 1986. Clinical feature-Overview. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A* **263**:201-205
185. **Steere, A. C., T. F. Broderick, and S. E. Malawista.** 1978. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* **108**:312-321
186. **Steere, A. C., D. Snyderman, P. Murray, J. Mensch, A. J. Main, R. C. Wallis, R. E. Shope, and S. E. Malawista.** 1986. Historical perspective of Lyme disease. *Zentbl. Bakteriol. Hyg. A* **263**:3-6
187. **Steil, B.** 2001. Die genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* L. 1758 in ausgewählten Naturherden Thüringens. persönliche Mitteilung (noch nicht veröffentlicht)
188. **Štípanová-Tresová, G., B. Pet'ko, A. Štéfančíková, and D. Nadzamová.** 2000. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in the *Ixodes ricinus* ticks from Eastern Slovakia. *Europ. J. Epidem.* **16**:105-109
189. **Strle, F.** 1999. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentbl. Bakteriol.* **289**:643-652
190. **Sumner, J. W., W. L. Nicholson, and R. F. Massung.** 1997. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2087-2092
191. **Sumption, K. J., D. J. M. Wright, S. J. Cutler, and B. A. S. Dale.** 1995. Human ehrlichiosis in the UK. *Lancet* **346**:1487-1488
192. **Süss, J., H. Dautel, O. Kahl, and A. Schönberg.** 2001. VI International Potsdam Symposium on tick-borne diseases, Programme and Compendium of abstracts. IPS-VI bggv
193. **Süss, J., and O. Kahl.** 1997. Tick-borne Encephalitis and Lyme Borreliosis. 4<sup>th</sup> International Potsdam Symposium on Tick-borne diseases Verlag: Pabst Science Publishers
194. **Süss, J., and O. Kahl.** 1999. 5<sup>th</sup> International Potsdam Symposium (IPS-V) on tick-borne diseases: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis. Verlag: Urban & Fischer
195. **Süß, J., and T. Zenk.** 1993. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen. Verlag: IMMUNO GmbH Heidelberg
196. **Talaska, T.** 1998. Für die Praxis: Lyme-Borreliose. ISBN 3-00-002363-1
197. **Tylewska-Wierzbanowska, S., T. Chmielewski, M. Kondrusik, T. Hermanowska-Szpakowicz, W. Sawicki, and K. Sulek.** 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur. J. Clin. Infect. Dis.* **20**:196-198
198. **van Dam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L. Spanjaard, A. C. Ramselaar, M. D. Kramer, and J. Dankert.** 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* **17**:708-717
199. **Vignes des, F., J. Piesmann, R. Heffernan, T. L. Schulze, K. C. Stafford III., and D. Fish.** 2001. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes*

- scapularis* nymphs. J. Infect. Dis. **183**:773-8
200. **Walker, A. R., M. P. Alberdi, K. A. Urquhart, and H. Rose.** 2001. Risk factors in habitants of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria. Med. Vet. Entomol. **15**: 40-49
201. **Walker, D. H., and J. S. Dumler.** 1996. Emergence of the Ehrlichiosis as human health problems. Emerg. Infect. Dis. **2**:18-29
202. **Walker, D. H., and J. S. Dumler.** 1997. Human monocytic and granulocytic ehrlichiosis. Discovery and diagnosis of emerging tick-borne infections and the critical role of the pathologist. Arch. Pathol. Lab. Med. **121**:785-791
203. **Walls, J. J., M. Agüero-Rosenfeld, J. S. Bakken, J. L. Goodman, D. Hossain, R. C. Johnson, and J. S. Dumler.** 1999. Inter- and intralaboratory comparison of *Ehrlichia equi* and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test. J. Clin. Microbiol. **37**:2968-2973
204. **Walls, J. J., B. Greig, D. F. Neitzel, and J. S. Dumler.** 1997. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. **35**:853-855
205. **Walter, G., and A. Liebisch.** 1980. Investigations on the biology and distribution of ticks (Ixodoidea, Ixodidae) in northern Germany. III. *Ixodes ricinus* (Linnaeus 1785). Zeitschrift für Angewandte Zoologie **67**:449-476
206. **Wang, G., A. P. v. Dam, I. Schwartz, and J. Dankert.** 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. **12**:633-653
207. **Weller, S. J., G. D. Baldrige, U. G. Munderloh, H. Noda, J. Simser, and T. J. Kurtti.** 1998. Phylogenetic placement of Rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. J. Clin. Microbiol. **36**:1305-1317
208. **Wicki, R., P. Sauter, C. Mettler, A. Natsch, T.ENZLER, N. Pusterla, P. Kuhnert, G. Egli, M. Bernasconi, R. Lienhard, H. Lutz, and C. M. Leutenegger.** 2000. Swiss army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* Genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne Encephalitis virus in ticks. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 427-432
209. **Wienecke, R., N. Zochling, U. Neubert, E. M. Schlupen, M. Meurer, and M. Volkenandt.** 1994. Molecular subtyping of *Borrelia burgdorferi* in erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. J. Invest. Dermatol. **103**:19-22
210. **Will, G., S. Jauris-Heipke, E. Schwab, U. Busch, D. Rossler, E. X. W. B. Soutschek, and V. Praec-Mursic.** 1995. Sequence analysis of ospA gene shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. Med. Microbiol. Immunol. (Berlin) **184**:73-80
211. **Wilske, B.** 1993 / 1994. Infektionen durch *Borrelia burgdorferi* (Lyme-Borreliose). Jahrbuch der Dermatologie–Infektion und Haut. Biermann Verlag FRG:127-154
212. **Wilske, B.** 1995. Diagnostik der *Borrelia-burgdorferi*-Infektion. Internist. **36**:114-119
213. **Wilske, B., J. F. Anderson, G. Baranton, A. G. Barbour, K. Hovind-Hougen, R. C. Johnson, and V. Praec-Mursic.** 1991. Taxonomy of *Borrelia* spp. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. **77**:108-129

214. **Wilske, B., A. G. Barbour, S. Bergström, N. Burman, B. I. Restrepo, P. A. Rosa, T. Schwan, E. Sontschek, and R. Wallich.** 1992. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. Res. Microbiol. **143**:583-596
215. **Wilske, B., and V. Fingerle.** 1996. Ehrlichiose. Münch. med. Wschr. **138** 12:202-204
216. **Wilske, B., and V. Fingerle.** 2000. Neue, durch Zecken übertragene Infektionskrankheit: die humane granulozytäre Ehrlichiose. mta Spektrum **7**:377-380
217. **Wilske, B., V. Praec-Mursic, U. B. Göbel et al.** 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. **31**:340-350
218. **Wilske, B., V. Praec-Mursic, G. Schierz, R. Kuhbeck, A. G. Babour, and M. Kramer.** 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **539**:126-143
219. **Wilske, B., R. Steinhuber, H. Bergmeister, V. Fingerle, G. Schierz, V. Praec-Mursic, E. Vanek, and B. Lorbeer.** 1987. Lyme-Borreliose in Süddeutschland. DMW **112**:1730-1736
220. **Wilson, K. H., R. B. Blitchington, and R. C. Greene.** 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polamerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **28**:1942-1946
221. **Wormser, G. P., H. W. Horowitz, J. S. Dumler, I. Schwartz, and M. Aguero-Rosenfeld.** 1996. False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis. Lancet **347**:981-982
222. **Yoshiie, K., H. Y. Kim, J. Mott, and Y. Rikihisa.** 2000. Intracellular infection by human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutropil apoptosis. Infect. Immun. **68**:1125-1133
223. **Yu, X. J., X. F. Zhang, J. W. McBride, Y. Zhang, and D. H. Walker.** 2001. Phylogenetic relationships of *Anaplasma marginale* and '*Ehrlichia platys*' to other Ehrlichia species determined by GroEL amino acid sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**:1143-1146
224. **Zeidner, N. S., T. R. Burkot, R. Massung, W. I. Nicholson, M. C. Dolan, J. S. Rutherford, B. J. Biggerstaff, and G. O. Maupin.** 2000. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in northern Colorado. J. Infect. Dis. **182**:616-619
225. **Zhang, Z. F., G. L. Duo, J. S. Zhang, K. L. Wan, G. F. Zhu, L. Zheng, H. Y. Wang, and X. X. Hou.** 1992. Survey on tick vectors of Lyme disease spirochetes in China. Chin. J. Vectors Biol. Control **1**:140-143
226. **Zhang, Z. F., K. L. Wan, and J. S. Zhang.** 1997. Studies on epidemiology and etiology of Lyme disease in China. Chin. J. Epidemiol. **18**:8-11
227. **Zhu, Z.** 1959. Ehrlichia-like microorganisms in the salavary glands of unfed *Ixodes ricinus* (acari: Ixodidae) nymphs. Acarologia **1**:3-8
228. **Zumstein, G., R. Fuchs, A. Hofmann, V. Praec-Mursic, E. Soutschek, and B. Wilske.** 1992. Genetic polymorphism of the gene encoding the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*. Med. Microbiol. Immunol. **181**:57-70
229. **Zung, J. L., S. Lewengrub, and M. A. Rudzinska.** 1988. Fine structural evidence for thr penetration of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* through the gut and salivary tissues of *Ixodes dammini*. Can. J. Zool. **67**:1737-1748

## **Danksagung**

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

Herrn Prof. Dr. med. E. Straube danke ich für die Überlassung des Themas, für die Vermittlung der Hospitation in München, für die Bereitstellung der sehr guten Arbeitsmöglichkeiten im Institut für Medizinische Mikrobiologie in Jena, für das Interesse am Fortgang der Arbeit und sein persönliches Engagement zur Realisierung, für die fachliche und finanzielle Unterstützung der Publikation der Ergebnisse, für das entgegengebrachte Vertrauen zum selbständigen Arbeiten, sowie für seine Offenheit gegenüber neuen Ideen und Vorschlägen, aber auch die hilfreichen Diskussionen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. habil. K.-H. Schmidt, der mich eine große Strecke begleitete und in naturwissenschaftliche Denk- und Arbeitsweisen einführte. Als Chemiker hatte er wesentlichen Anteil am Gelingen der Arbeit. Obwohl er sich in seiner Forschungsarbeit hauptsächlich mit Streptokokken beschäftigt, nahm er sich meiner Thematik der Ehrlichien und Borrelien mit großem Engagement an. Durch aufrichtige Kritik, geduldige Gesprächsbereitschaft, fachlich wertvolle Anregungen und kompetente Beratung in allen Problemsituationen war es sehr angenehm, mit ihm zusammenzuarbeiten.

Frau G. Gaschler möchte ich herzlich danken für die freundschaftliche Unterstützung der praktischen Arbeit im Labor. Sehr hilfreich für mich waren fachliche Gespräche, in die Ihre langjährigen Erfahrungen einfließen, aber auch das mit viel Mühe verbundene kritische Korrekturlesen des Manuskriptes der Arbeit.

Bei Frau R. John möchte ich mich für die freundliche Begleitung meiner ersten Schritte der genetischen Sequenzanalyse und Klonierungsversuche bedanken, wodurch ich schnell relativ selbständig und nicht an eine Tageszeit gebunden arbeiten konnte.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena danke ich besonders für die herzliche Aufnahme und Integration in den Mitarbeiterkreis, was mir das Arbeiten erleichterte und wodurch es für mich nicht ganz einfach ist, das Institut zu verlassen.

Herrn Prof. Dr. med. vet. W. Dorn und Frau C. Flügel des Institutes für Ernährung und Umwelt der FSU Jena gilt mein spezieller Dank für die Unterstützung der Zeckensammlung und die Bereitstellung von Borrelienstämmen, v.a. des Stammes *B. valaisiana*, wodurch es mir möglich war, das Thema meiner Arbeit bezüglich der Borrelienspeziesdifferenzierung weiter auszubauen.

Bei Frau Dr. B. Wilkse und Herrn Dr. med. V. Fingerle und Frau C. Hizo-Teufel des Max-von Pettenkofer-Institutes München möchte ich mich bedanken für die freundliche Aufnahme während meiner Hospitationszeit, die Einführung in molekulargenetische Methoden, die Überlassung von Protokollen und Borrelienstämmen, aber auch einer Positivkontrolle für Ehrlichien (von U. G. Munderloh der Universität von Minnesota), sowie die Hilfsbereitschaft zum Lösen von Problemen.

Ein besonderes Dankeschön gebührt meiner Familie, die mir das Medizinstudium ermöglicht hat und mir stets mit Verständnis und Hilfe bei Problemen im Studium, aber auch bei der Durchführung dieser Arbeit zur Seite stand.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Freunden vom Karate, aus dem Wohnheim und im Studium, sowie Christine Materne und Svea Sachse bedanken, die mir durch unterstützende Gespräche Selbstvertrauen und die notwendige Kraft, mit schwierigen Situationen umzugehen, vermittelt haben.

## Publikationen zu den Ergebnissen dieser Arbeit

- ❖ **Hildebrandt, A., K. H. Schmidt, V. Fingerle, B. Wilske, and E. Straube.** 2001.  
Prevalence of *Granulocytic Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment.  
→ eingereicht

- ❖ **Hildebrandt, A., K. H. Schmidt, V. Fingerle, B. Wilske, and E. Straube.** 2001.  
Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Granulocytic Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks from Middle Germany (Thuringia)  
→ eingereicht

## Aktualisierung

### Publikationen zu den Ergebnissen dieser Arbeit

- ❖ **Hildebrandt, A., K. H. Schmidt, V. Fingerle, B. Wilske, and E. Straube.** Prevalence of granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment  
FEMS microbiology Letters **211** (2002):225-230
  
- ❖ **Hildebrandt, A., K. H. Schmidt, V. Fingerle, B. Wilske, and E. Straube.** 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 (2003) **22**: 364-367

## Lebenslauf

Anke Hildebrandt

geboren am 05. Juli 1978 in Gotha

September 1985 - Juli 1991:	Wilhelm-Pieck-Oberschule 99867 Gotha
seit September 1991:	Gymnasium Ernestinum 99867 Gotha
Schulabschluß Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
seit Oktober 1997	Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
seit Mai 1999	Arbeit an der vorliegenden Dissertation
September 1999	Ärztliche Vorprüfung
September 2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.10 - 06.10.2000	Hospitation am Max-von-Pettenkofer-Institut in München im Rahmen der Promotionsarbeit zur Aneignung molekulargenetischer Techniken
<i>Famulaturen</i>	
17.2. - 17.03.2000	Famulatur Allgemeinarztpraxis; Frau Dr.med. Helga Trautmann, Gotha
30.08 - 30.09.2000	Famulatur in der Klinik für Innere Medizin in Jena
01.08. - 31.08.2001	Arbeit als Unterassistentin im Fachbereich Innere Medizin im Paracelsus-Spital in Richterswil (Schweiz)
01.09. - 30.09.2001	Arbeit als Unterassistentin im Fachbereich Chirurgie im Paracelsus-Spital in Richterswil (Schweiz)

Jena, den 10.01.2002

Anke Hildebrandt

## **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 Manuscriptes unterstützt haben: Herr Dr. rer. nat. habil. K.-H. Schmidt, Frau G. Gaschler,

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 Themen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10.01.2002

Anke Hildebrandt