Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* und *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken aus einem Naherholungsgebiet Jenas

Dissertation

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

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

von Angela Luise Krämer
geboren am 06.Juni 1984 in Lahnstein

Erster Gutachter: ……..

Zweiter Gutachter: ……..

Dritter Gutachter: ..……

Tag der öffentlichen Verteidigung: ……

Abkürzungsverzeichnis

Acc.Nr.	*Account Number*
A. phagocyt.	*Anaplasma phagocytophilum*
A. equi	*Anaplasma equi*
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Aqua dest.	*Aqua destillata* (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
Aug	August
B.	*Borrelia*
B. burgd.	*Borrelia burgdorferi* nach neuer Nomenklatur: *Borrelia* spp.
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C.	*Coxiella*
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
cm	Zentimeter
CRP	C- reaktives Protein
d	desoxy
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat behandeltes Wasser für Molekularbiologie
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
rDNA	ribosomale DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleinsäure- triphosphat
EDTA	Ethylendiamin- Tetraessigsäure
et al.	und andere

F.	*Francisella*
FSME	Früh- Sommer- Meningo- Enzephalitis
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
gltA	Citrat- Synthase- Gen
groEL	58- 65kDa großes Protein, gehört zur Familie der HSP60
h	Stunde
HGA	humane granulozytäre Anaplasmose
HGE	humane granulozytäre Ehrlichiose
HL60- Zellen	humane Promyelozyten- Zelllinie
HME	humane monozytäre Ehrlichiose
IFA	Immunfluoreszenzassay
Jun	Juni
Jul	Juli
Ig	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharid
µ	Mikro
m	Meter
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
msp2	*major surface protein* 2
Nov	November
OD	optische Dichte
Okt	Oktober
Osp	*outer surface protein* (Oberflächenprotein)
p44- Gen	Gen das für ein 44 kDa großes Oberflächenprotein kodiert
PBS	*phosphated buffered saline*
PCR	*polymerase- chain- reaction* (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
p. o.	per os
rac2	*Ras related C3 botulinum toxin substrate* 2
R. helvetica	*Rickettsia helvetica*

R. monacensis	*Rickettsia monacensis*
RFLP	*restriction fragment length polymorphism* (Längenpolymerismus der Restriktionsfragmente)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
PBS	*phosphate buffered saline*
pH	*potentia Hydrogenii*
pos.	positiv
rpm	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
r	rückwärts
s	Sekunde
Sep	September
semi nested PCR	erneute Amplifikation des Amplikons einer ersten PCR unter Verwendung eines Primers der initialen PCR und eines neuen Primers, welcher in innerhalb des Amplikons liegt
SFG	*Spotted Fever Group*
ssp.	*Subspecies*
spp.	*species plurales*
SPSS	Softwareprogramm zur statistischen Analyse von Daten
SYBR Green I	DNA- bindender Farbstoff
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat/ EDTA Puffer
Taq	DNA abhängige DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus*
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units (Einheit enzymatischer Aktivität)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v	vorwärts
V	Volt
v. a.	vor allem
z. B.	zum Beispiel

1. ZUSAMMENFASSUNG 1

2. EINLEITUNG 3

2.1. *Ixodes ricinus* 3

2.1.1. Taxonomie 3
2.1.2. Morphologie 3
2.1.3. Saugakt 4
2.1.4. Entwicklung 6
2.1.5. Umweltbedingungen 7
2.1.6. Prophylaxe 8

2.2. *Anaplasma* spp. 9

2.2.1. Morphologie und Stoffwechsel 9
2.2.2. Geschichte 10
2.2.3. Nomenklatur 10
2.2.4. Reservoir 11
2.2.5. Epidemiologie 11
2.2.6. Klinik 12
2.2.7. Diagnostik 13
2.2.8. Therapie 15
2.2.9. Prophylaxe 16

2.3. *Rickettsia* spp. 17

2.3.1. Morphologie und Stoffwechsel 17
2.3.2. Geschichte 17
2.3.3. Nomenklatur 18
2.3.4. Reservoir 18
2.3.5. Epidemiologie 19
2.3.6. Klinik 20
2.3.7. Diagnostik 21
2.3.8. Therapie 22
2.3.9. Prophylaxe 22

3. ZIELE DER ARBEIT 23

4. METHODIK 24

4.1. Allgemeine Methoden 24

4.1.1. Sammeln der Zecken 24

4.1.2. DNA Extraktion aus der Zecke 25

4.1.3. Photometrische Reinheitsmessung der extrahierten DNA 26

4.1.4. Polymerasekettenreaktion (PCR) 27

4.1.5. Agarose Gelelektrophorese 28

4.1.6. Restriktionsverdau 29

4.1.7. Sequenzierung 29

4.1.8. Statistik 31

4.2. Untersuchung der Zecken auf *Anaplasma phagocytophilum* 32

4.3. Untersuchung der Zecken auf *Rickettsia* spp. 35

4.4. Untersuchung der Zecken auf weitere Erreger 37

4.4.1. *Babesia* spp. 37

4.4.2. *Borrelia* spp. 37

4.4.3. *Coxiella burnetii* 37

4.4.4. *Francisella tularensis* 37

4.5. Materialien 38

4.5.1. DNA Extraktion 38

4.5.2. Photometrische Konzentrationsmessung 38

4.5.3. PCR 38

4.5.4. Gel Elektrophorese 39

4.5.5. Restriktionsverdau 39

4.5.6. DNA Extraktion aus dem Gel 39

4.5.7. Sequenzierung 40

5. ERGEBNISSE 41

5.1. DNA Extraktion aus der Zecke 41

5.2. Ergebnisse der PCR und Sequenzierung von *Anaplasma* spp. 41

5.3. Ergebnisse der PCR und Sequenzierung der *Rickettsia* spp. 43

5.4. Prävalenzen **46**

5.4.1. *Anaplasma* spp.: Entwicklungsstadium und saisonale Abhängigkeit **46**

5.4.2. *Rickettsia* spp.: Entwicklungsstadium und saisonale Abhängigkeit **47**

5.4.3. Statistik **49**

5.4.4. Koinfektionen **49**

6. DISKUSSION **54**

6.1. *Anaplasma phagocytophilum* **54**

6.1.1. Prävalenz **54**

6.2. *Rickettsia* spp. **59**

6.2.1. Prävalenz **59**

6.3. Koinfektionen **62**

6.4. Diskussion der Methoden **64**

6.4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden **64**

6.4.2. Diskussion der Fragestellung **66**

6.4.3. Ausblick **67**

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN **69**

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS **71**

9. ANHANG **81**

9.1 SPSS- Tabellen **81**

9.2. Abbildungsverzeichnis **87**

9.3. Tabellenverzeichnis **89**

9.4. Lebenslauf **91**

9.5. Publikationen und Kongressbeiträge **92**

9.6. Danksagung **93**

1. ZUSAMMENFASSUNG

Durch Zecken übertragbare Erkrankungen rückten während der letzten Jahre vermehrt ins Bewusstsein der europäischen Bevölkerung. Der Trend, seine Freizeit in den Sommermonaten in der Natur zu verbringen, erhöht das Expositionsrisiko für die Übertragung pathogener in Zecken lebender Bakterien, Viren und Parasiten.

Ein wichtiger Schritt zur Einschätzung des Risikos an einem Zeckenbiss zu erkranken ist der Nachweis dieser Pathogene in ihren Vektoren.

Thüringen und die Umgebung von Jena, welche als Sammelgebiet von *Ixodes ricinus* diente, gelten als Risikogebiet für Frühsommermeningoencephalitis (FSME) und Borreliose (Robert Koch Institut (RKI 2011)). Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp. als Einzel- und Koinfektion in *Ixodes ricinus*. Bisher ist kein systematischer Nachweis von *Rickettsia* spp. in Thüringen dokumentiert. Diese intrazellulär lebenden humanpathogenen Bakterien können fieberhafte Infektionen verursachen, welche gerade bei immungeschwächten Patienten letal verlaufen können. Vor allem Koinfektionen der wirtssuchenden Zecken bergen die Gefahr einer Mehrfachinfektion des Menschen, welche meist atypisch und schwerwiegender veräuft als die jeweils einzelne Infektion (Swanson et al. 2006, Grab et al. 2007). Von Mai bis Oktober 2006 und April bis September 2007 wurden *Ixodes ricinus* Zecken im thüringischen Zeitzgrund gesammelt. Anschließend untersuchten wir 1000 gefangene Zecken, welche sich zu gleichen Anteilen aus Nymphen, Weibchen und Männchen zusammensetzten, auf die Prävalenz von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp.. Die ermittelte Prävalenz für *Rickettsia* spp. betrug 2006 19,2% und 2007 10,1%. Adulte Zecken waren mit 18,8% signifikant häufiger infiziert als Nymphen mit 9,3% (2006: p = 0,001, 2007: p = 0,022). 64 der 147 *Rickettsia* spp. positiven Amplifikate wurden sequenziert, hierbei fand sich am häufigsten *R. helvetica* (29/64), gefolgt von *R. monacensis* (12/64). Bei 23 der 64 sequenzierten Amplifikate konnte aufgrund der geringen genetischen Differenz im *gltA* Gen innerhalb der Spezies *Rickettsia* spp. lediglich der Genus *Rickettsia* zugewiesen werden. *Anaplasma* spp. wurde 2006 in 6,7% und 2007 in 4,0% der untersuchten Zecken detektiert. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Prävalenz des

Bakteriums in Nymphen oder Adulten. In der anschließend durchgeführten Sequenzierung fand sich zu 100% die Spezies *Anaplasma phagocytophilum.*

Zusammenfassend gelang in dieser Arbeit erstmalig ein systematischer Überblick der Prävalenz von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp., in ihrem Hauptvektor *Ixodes ricinus* in Thüringen. Darüberhinaus wurden in weiteren Arbeiten die gleichen Zecken auf *Borrelia* spp., *Babesia* spp. (Katharina Pauliks, Institut für Medizinische Mikrobiologie der FSU Jena), *Coxiella burnetii* (Gernot Schmoock, FLI Jena) *Francisella tularensis* (Wolf Splettstößer, Referenzzentrum München) untersucht.

In Zusammenschau mit den erwähnten Arbeiten stellt die vorliegende Dissertation einen wichtigen Anteil an dem Gesamtbild der zeckenassoziierten Erreger im Untersuchungsgebiet Thüringen dar.

2. EINLEITUNG

2.1. *Ixodes ricinus*

2.1.1. Taxonomie

Ixodes ricinus, der gemeine Holzbock, ist der Hauptvertreter der europäischen Zecken. Er gehört zur Familie der Schildzecken (Ixodidae), welche sich in die Ordnung der Milben (Acarina) reihen. Diese bilden eine Unterklasse der Klasse der Spinnentiere (Arachnidae) die wiederum dem Stamm der Gliederfüssler (Arthropodae) untergeordnet sind. Von den Milben unterscheiden sich die Zecken durch die Lage der *Stigmen* (Atemöffnungen) hinter dem vierten Beinpaar. Sie unterteilen sich in drei Familien: die Ixodidae, die Argasidae und die in Afrika heimische Nuttalliellidae (Sonenshine 1991).
Zur Familie der Ixodidae gehören 19 Gattungen mit ca. 650 Arten, wobei die im Jahr 1758 von Linneaus erstmalig klassifizierte *Ixodes ricinus* mit 90% den Großteil der in Deutschland vertretenen Arten ausmacht (Rufli und Mumcuoglu 1981). Ihr Name leitet sich von dem dorsalseitig gelegenen Schild (*Scutum*) aus Chitin ab (Parola und Raoult 2001).

2.1.2. Morphologie

Der Körperbau von *Ixodes ricinus* gliedert sich zum einen in das *Gnasthosoma* mit den Mundwerkzeugen zum anderen in das *Idiosoma*, welches aus dem die Beine tragendem *Podosoma* und dem die Abdominalorgane enthaltendem *Opisthosoma* besteht. Die Mundwerkzeuge setzten sich von außen nach innen aus den als Tastorgane dienenden paarigen *Pedipalpen*, dann den zum Aufschneiden der Wirtshaut mit scharfen Zähnen versehenen paarigen *Cheliceren* und dem mittig gelegenem *Hypostom* als Saugrohr zusammen (Hillyard 1996).
Die circa 0,6 mm großen Larven wirken gelblich transparent und besitzen nur drei Beinpaare. Die etwa doppelt so großen Nymphen weisen ebenso wie die adulten Tiere vier mit Krallen besetzte Beinpaare auf. Das letzte Segment des vorderen Beinpaares beherbergt das Hallersche Organ. Dieses Sinnesorgan fungiert als Chemorezeptor zur Wahrnehmung von Ammoniak, Laktat, Buttersäure und

Kohlendioxid. Außerdem detektiert es Vibrationen und ist somit essentiell zum Auffinden eines geeigneten Wirtes (Sonenshine 1991).
Der ausgeprägte Geschlechtsdimorphismus tritt erst bei den adulten Tieren auf. Die Weibchen sind durch ein rotbraunes *Idiosoma* gekennzeichnet, dessen *Cuticula* lediglich im kranialen Drittel durch das nicht dehnbare *Scutum* bedeckt ist. Dies ermöglicht Ihnen während einer Blutmahlzeit von 3 mm im nüchternen Zustand auf 110 mm anzuwachsen. Die Männchen sind mit 2,6 mm kleiner und nehmen kaum Blut auf, ihr Idiosoma ist vollständig durch das schwarzbraune *Scutum* bedeckt. Im hinteren Teil des *Idiosomas* liegt ventralseitig bei allen Entwicklungsstadien die Analöffnung und nur bei den adulten Tieren im vorderem Drittel des *Idiosomas* die Geschlechtsöffnung (Hillyard 1996).

2.1.3. Saugakt

Die Zecke sucht eine warme und feuchte Körperpartie des Wirtes mit dünner Epidermis auf. Beim Menschen trifft dies vor allem auf Kniekehlen, Leistenbeugen und Haaransätze zu. Dort schneidet sie mit den *Cheliceren* die Epidermis auf und führt das mit Widerhaken besetzte *Hypostom* ein. Ein eingebrachtes Sekret besitzt antikoagulatorische, antiphlogistische, vasodilatorische und analgetische Wirkung. Die Sekretion von schnell erhärtenden Zementsubstanzen führt zu einer verbesserten Haftung der Zecke an der Saugstelle und zu einem zügigen Verschluss des epidermalen Defektes. Aus der gebildeten Wundgrube saugt sie Lymphe, Blut und zersetzte Gewebsbestandteile. Die Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme oder Übertragung mit Erregern erhöht sich mit der Dauer des Saugaktes. Ixodidae benötigen für einen Saugakt zwei bis fünfzehn Tage. Dieser verläuft zunächst langsam unter zeitgleichem Ablauf von Verdauungsvorgängen und beschleunigt sich gegen Ende der Blutmahlzeit (Sonenshine 1991).
Die während des Saugaktes aufgenommenen Erreger penetrieren die Darmwand und wandern zu den Speicheldrüsen der Zecke (Gray 2002). Dort persistieren sie während der Weiterentwicklung ihres Wirtstieres und können vom Larvenstadium, über die Nymphe bis zum adulten Tier überdauern. Diese Weitergabe nennt man transstadial (Hillyard 1996). Transovarial wird die Übertragung des Erregers vom Weibchen an die nächste Generation bezeichntet (Burgdorfer und Brinton 1975). Eine andere Möglichkeit stellt die sexuelle Übertragung der Mikroorganismen vom Männchen auf die Weibchen während der Kopulation dar (Hayes et al. 1980). Die

vierte Möglichkeit ist das *Cofeeding,* die Übertragung eines Erregers zwischen zwei Zecken während des Saugaktes. Pheromone bewirken eine Akkumulation der Zecken an einem Säugetier und begünstigen Paarung sowie *Cofeeding* (Brouqui et al. 2007, Jones et al. 1987).
Einige Spezies wie z.B. die Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus* sind überaus wirtsspezifisch, wohingegen *I. ricinus* und *Amblyomma* nahezu alle Säugetiere als Wirte verwenden (Raoult und Roux 1997).

Schildzecken beherbergen Erreger mit humanpathogenen Eigenschaften, welche die in Tab. 2.1. in Klammern genannten Erkrankungen hervorrufen können *(European Centre for Disease Prevention and Control – Tick borne diseases)*:

DURCH ZECKEN ÜBERTRAGBARE ERKRANKUNGEN	IN ZECKEN NACHGEWIESENE ERREGER MIT HUMANPATHOGENEN EIGENSCHAFTEN
Anaplasmen (Humane granulozytäre Anaplasmose, humane monozytäre Anaplasmose)	Brucellen (Brucellose)
Babesien (Babesiose)	Coxiellen (Q- Fieber)
Borrelien (Borreliose)	Franciellen (Tularämie)
Rickettsien (Rickettsiose)	Leptospiren (Morbus Weil)
RSSE (Russian- Spring- Summer- Encephalitis)	
FSME (Früh- Sommer- Meningo- Enzephalitis)	

Tab. 2.1.
In Zecken identifizierte Erreger mit humanpathogenen Eigenschaften

2.1.4. Entwicklung

Der Entwicklungszyklus der dreiwirtigen Schildzecke dauert zwei bis sechs Jahre und umfasst vier Entwicklungsstadien. Während der einzelnen Entwicklungsstufen hält sich *Ixodes ricinus* bevorzugt im Laub auf, welches die benötigte Luftfeuchtigkeit von ungefähr 85% bietet (Gray 2002, Gray 1991).

Nach dem Schlüpfen der Larve aus dem Ei sucht sie sich bodennahe Wirte, meist kleine Nagetiere. Nach der ersten Blutmahlzeit beginnt die bis zu zwei Monate dauernde Häutung auf dem Erdboden, welche eine Nymphe hervorbringt. Diese befindet sich v. a. auf Grashalmen in 30 bis 60 cm Höhe und wählt größere Nagetiere oder Vögel, von welchen sie zwischen zwei bis sieben Tagen Blut saugt. Die anschließende Entwicklung zum adulten Tier verläuft, je nach Witterungsbedingungen, über zwei bis acht Monate. Die adulte Zecke kann bis zu 1,40 m hohe Vegetationen erklimmen, so dass Rotwild, Schwarzwild oder Haustiere als mögliche Wirte in Frage kommen (Sonenshine 1991). Alle Entwicklungsstadien können den Menschen als Wirt benutzen, wobei dies am häufigsten bei Nymphen geschieht (Gray 2002).

Nach erfolgtem Saugakt suchen sich die gegengeschlechtlichen adulten Tiere pheromongeleitet zur Paarung. Nach erfolgter Ejakulation stirbt das Männchen, im Weibchen verschmelzen die mit Samenflüssigkeit gefüllten Zysten mit den Oozyten und bilden befruchtete Eier. Das Weibchen benötigt für das Legen jedes seiner zirka 3000 Eier durchschnittlich 10 Minuten. Jedes Ei wird mit Hilfe des Genéschen Organs mit einer Wachsschicht umgeben um es vor dem Austrocknen zu schützten. Nach erfolgter Eiablage stirbt das Weibchen (Sonenshine 1991).

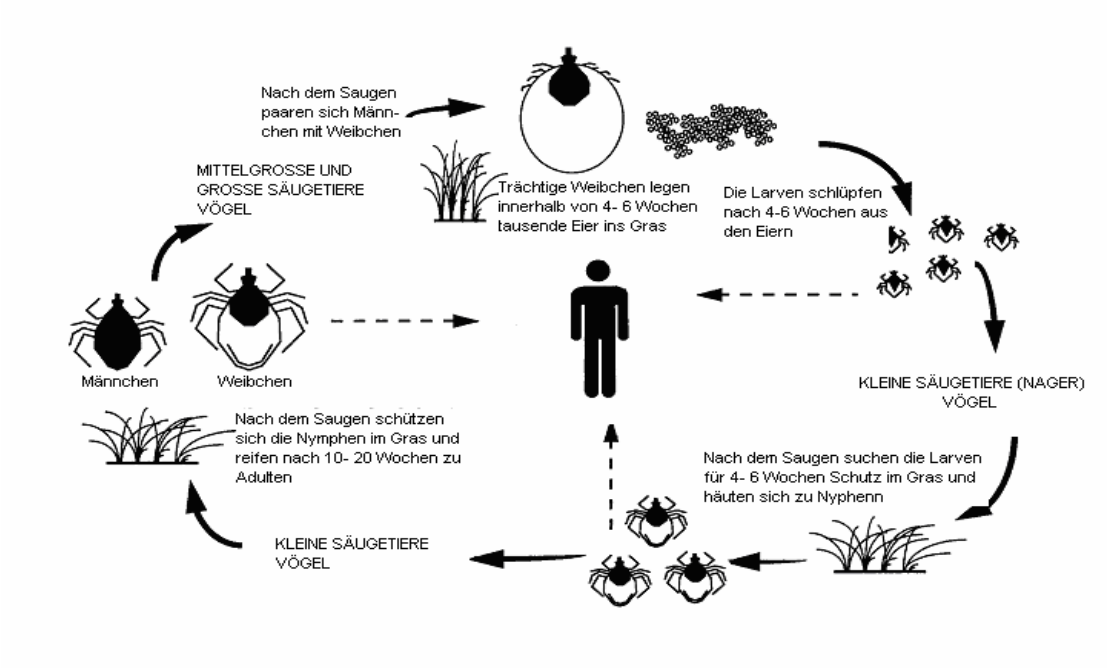


Abb. 2.1.

Die Entwicklung von *Ixodes ricinus* bearbeitet nach (Parola und Raoult 2001)

2.1.5. Umweltbedingungen

Ixodes ricinus benötigt zum Überleben eine Luftfeuchtigkeit von ca. 85%, welche auf Waldböden oder feuchten Wiesen erreicht wird. Ideal sind eine Jahresdurchschnittstemperatur von etwa 8°C und eine jährliche Niederschlagsmenge von über 800 mm. Innerhalb Europas ist *Ixodes ricinus* mit Ausnahme der Mittelmeerküste und der Höhenlagen über 1000 m über dem Meeresspiegel weit verbreitet. In Zentraleuropa erreicht die Aktivität in den Frühsommermonaten ihren Höhepunkt und sinkt mit ansteigenden Temperaturen im Sommer. Mit steigender Luftfeuchtigkeit und fallenden Temperaturen kommt es im Herbst häufig zu einem zweiten Aktivitätsanstieg (Parola et al. 1998).

Optimale Temperaturen für die Wirtssuche liegen zwischen 14 bis 24°C, wobei die Stadienentwicklung zwischen 15 bis 34°C am besten geschehen kann. Die Aktivität und Entwicklung wird während ungünstiger klimatischer Bedingungen pausiert, dieser Zustand wird als Diapause bezeichnet (Belozerov 1982).

Bei Nymphen existiert außerdem eine zirkadiane Rhythmik, wobei eine gesteigerte nächtliche Aktivität beobachtet werden kann (Sonenshine 1991).

2.1.6. Prophylaxe

Der sicherste Schutz ist die Meidung von Zeckenhabitaten, ansonsten sollte man diese nur mit heller den Körper vollständig bedeckender Kleidung aufsuchen. Als Repellents existieren Permethrin zur Imprägnierung der Kleidung und N, N-diethyl- m- toluamide, DEET und Icaridin als schützende Hautlotion. Diese sollten eine halbe Stunde vor beginnender Exposition aufgetragen werden (RKI, Fachinformation). Ebenfalls werden mit Repellents imprägnierte Kleidungsstücke angeboten.

Nach Spaziergängen durch Wiesen oder auf laubigen Waldwegen empfiehlt sich ein gründliches Absuchen des Körpers sowie ein zügiger Kleidungswechsel, da Zecken in Kleidungsstücken verharren können (Kahl et al. 1998). Die Zeckenentfernung sollte mit Hilfe einer Pinzette, Zeckenzange oder Skalpell erfolgen. Ebenfalls sollte man keine aggressiven Substanzen wie z. B. Alkohol zum Lösen verwenden, da dies eine erhöhte Speichelsekretion herbeiführen kann. Ein Drehen der Zecken ist zu vermeiden, da die durch den Zement befestigten Pedipalpen abbrechen können und in diesem Fall der Kopf nicht mit entfernt wird. Nach erfolgreicher Entfernung sollte die Wunde sorgfältig desinfiziert werden. (Parola und Raoult 2001).

2.2. *Anaplasma* spp.

2.2.1. Morphologie und Stoffwechsel

Anaplasma phagocythophilum ist ein ungefähr 0,5 bis 2 µm großes, kokkoid bis elipsoid geformtes gram- negatives Bakterium.

Alle Mitglieder der Familie der Anaplasmataceae sind obligat intrazellulär lebende Bakterien Die Vermehrung findet in aus eukaryontischer Wirtsmembran entstandenen Endosomen statt (Dumler et al. 2001). Diese lagern sich zu so genannten Morulae zusammen, welche in eukaryonten Zellen meist 1,5 bis 2,5 µm groß sind, jedoch auch Durchmesser von 6 µm erreichen können (Popov et al. 1998). Eine Morula besteht aus mindestens 3 bis teilweise über 50 Bakterien (Dumler und Bakken 1998). Die meisten Morulae enthalten *A. phagocytophilae* mit retikulierten oder dichten Kernen, die sich sowohl gleichmäßig wie auch ungleichmäßig teilen können. Typisch ist das Fehlen von Mitochondrien oder Zisternen des endoplasmatischen Retikulums in der unmittelbaren Nähe der Endosomen, obwohl viele zytoplasmatische Vesikel mit ihnen im Kontakt stehen (Maeda et al. 1987). Dies könnte ein Hinweis auf eine von den Mitochondrien unabhängige Art der Energiegewinnung sein.

Die Replikation durch binäre Teilung findet in mesenchymalen Säugetierzellen, genauer in sowohl undifferenzierten als auch gereiften hämatopoetischen Progenitorzellen bevorzugt der myeloischen Reihe statt (Rikihisa et al. 1991). Diese phagozytieren *A. phagocytophilum,* wobei die Fusion eines so entstandenen Endosoms mit einem Lysosom durch das eingedrungene Bakterium verhindert wird. Die Übertragung zwischen den einzelnen Wirtszellen geschieht nicht nur nach Freisetzung durch Zelllyse, sondern auch durch Exozytose mit nachfolgender Endozytose zweier benachbarter Zellen. *A. phagocytophilum* verhindert den *respiratory burst* der Granulozyten durch *Downregulation* von gp91 und rac2, zwei wichtigen Komponenten der NADPH Oxidase (Woldehiwet 2010).

Das aerobe Bakterium kann aus Glutamin und Glutamat ATP bilden, wobei es im Gegensatz zu *Rickettsia* spp. Glutamin bevorzugt, da dieses besser die umhüllende Vakuolenmembran penetrieren kann. *A. phagocytophilum* vermag es ebenso wenig wie *Rickettsia* spp. Glucose oder Glucose- 6- Phospat zu metabolisieren. Der Stoffwechsel läuft optimal bei einem pH von 7,2 bis 8 ab.

E. chaffeensis infiziert bevorzugt Monozyten, *E. ewingii* und *A. phagocytophilum* neutrophile Granulozyten (Thomas et al. 2009).

2.2.2. Geschichte

Donatien und Lestoquard mikroskopierten 1935 periphere Monozyten von fünf fiebernden Hunden und sahen in diesen kokkoide Bakterien, welche sie *Rickettsia canis* (Donatien 1935) nannten. Tyzzer beschrieb 1938 erstmalig granulozytotrophe Bakterien in Mäusen und prägte die Bezeichnung *Cytocetes microti* (Tyzzer 1938). Moshkovski setzte eine Namensänderung zu Ehren Paul Ehrlichs durch und benannte die kokkoiden Bakterien *Ehrlichia canis (Moshkovski 1945)* Die erstmalig dokumentierte humane monozytären Ehrlichiose ereignete sich 1986 in den USA (Maeda et al. 1987). Bakken und Chen beschrieben 1994 in fiebernden Patienten erstmalig die humane granulozytären Ehrlichiose (Bakken et al. 1994, Chen et al. 1994). In Europa wurde in Portugal 1991 zum ersten Mal von einer humanen *E. chaffeensis* Infektion berichtet (Morais et al. 1991), 1995 gelang in Belgien der erste serologische Nachweis einer *A. phagocytophilum* Infektion (Pierard et al. 1995) und 1997 ereignete sich der erste molekular bewiesene Fall einer humanen granulozytären Ehrlichiose (HGE) in Slowenien (Petrovec et al. 1997). Bis März 2003 traten 65 bewiesene Fälle einer humanen granulozytären Anaplasmose in Europa auf, wobei sich diese hauptsächlich in Schweden und Slovenien ereigneten (Strle 2004). Die übrigen Fälle ereigneten sich in Griechenland (Chochlakis et al. 2009, Psaroulaki et al. 2008), Polen (Grzeszczuk et al. 2009), Norwegen (Stuen und Bergstrom 2008, Stuen et al. 2005), Österreich (Walder et al. 2006, Walder et al. 2003), Italien (de la Fuente et al. 2005a) und Frankreich (Remy et al. 2003) auf.

2.2.3. Nomenklatur

Gorden differenzierte 1932 als erster die Zecken- Fieber- Gruppe von der Drehkrankheit der Schafe, welche in Schottland erstbeschrieben wurde und postulierte ihre Zugehörigkeit zur Gattung der *Rickettsia* (W. S. Gordon 1932).
Der Begriff *Ehrlichia* als Gattungsbezeichnung wurde erst 1945 zu Ehren von Paul Ehrlich geprägt (Moshkovski 1945). Rikihisa formuliert 1991 Vorschläge zur Klassifizierung des Stammes Ehrlichiae, zu welchem er *Ehrlichia*, *Cowdria* und

Neorickettsia zählte (Rikihisa 1991). Die Ehrlichien gehören gemeinsam mit den Rickettsien und Wolbachien zur Familie der Rickettsiaceae (Dumler et al. 2001).
2001 veröffentlichen Dumler et al. eine umfassende Arbeit zur Reklassifikation der Spezies Rickettsiales anhand Sequenzanalysen des 16S rRNA- Gens. Er schlägt eine Differenzierung in zwei Familien vor, den Rickettsiaceae (*Rickettsia, Orientia*) welche sich intrazytoplasmatisch replizieren und den Anaplasmataceae (*Neorickettsia, Wolbachia, Ehrlichia, Anaplasma*) die in den infizierten Wirtszellen nur in Vakuolen vorkommen (Dumler et al. 2001). Unter der Bezeichnung *A. phagocytophilum* wurden die zuvor als *E. equi, E. phagocytophila* und HGE-agent bekannten Bakterien zusammengefasst und 2002 in *A. phagocytophilum* umbenannt (Dumler 2002).

2.2.4. Reservoir

Als wichtige Reservoire dienen *A. phagocytophilum* in Europa Waldmäuse, Waldwühlmäuse, gewöhnliche Spitzmäuse, Rehe, Füchse, Schwarzwild sowie Pferde, Rinder, Schafe und Hunde (Dugan et al. 2006, Grzeszczuk et al. 2006, Schultz et al. 2002, De La Fuente et al. 2004, De La Fuente et al. 2005b).
Die infizierten Tiere leiden unter Fieber, Thrombopenie, Leukopenie, Reduktion der Milchproduktion und der Wachstumsrate sowie Aborten und frühzeitigem Abstillen. Meistens erholen sich die Wirte zwei Wochen nach Krankheitsbeginn, jedoch kann *A. phagocytophilum* bis zu 25 Monate in ihnen persistieren und in diesem Zeitraum parenteral übertragen werden (Rikihisa 1991).
Eine transovarielle Übertragung infizierter *Ixodes ricinus* konnte bislang noch nicht beobachtet werden, wohingegen die transstadielle Weitergabe bewiesen ist (Bakken und Dumler 2006).

2.2.5. Epidemiologie

Die meisten Infektionen treten zwischen Mai und August auf und betreffen zu ungefähr 60% Männer mit einem Altersmedian von 50 Jahren (Dumler et al. 2007). Im Vergleich zu einer relativ hohen Seroprävalenz von bis zu 15,4% treten nur wenige manifeste Infektionen (Inzidenz 52/100.000) auf (Bakken und Dumler 2006). Dies könnte durch die Bildung von Antikörpern gegen apathogene Stämme oder eine diagnostische Lücke durch den unspezifischen Krankheitsverlauf bedingt sein (Portillo et al. 2005) Meistens akquirieren die Patienten

A. phagocytophilum durch einen Zeckenbiss, jedoch existieren Einzelberichte über eine perinatale Infektion (Horowitz et al. 1998) sowie über zwei parenterale Infektionen nach Bluttransfusionen in Minnesota (Eastlund 1999, Kemperman M. 2008).

2.2.6. Klinik

Die Inkubationszeit der humanen granulozytären Anaplasmose (HGA) beträgt zwischen sieben und zehn Tagen bevor unspezifischen Symptome wie starke Kopfschmerzen, fieberhafte Temperaturen bis über 39°C, Muskelschmerzen und Schüttelfrost beginnen. Zusätzlich können Gelenkschmerzen, Schwindel, unproduktiver Husten, Exantheme und Anorexie auftreten (Blanco und Oteo 2002). Die Häufigkeit der einzelnen Symptome beschrieb Dumler in einer Übersichtsarbeit (Dumler 2007), welche in der Abb. 2.2. zusammengefasst sind. Die HGA kann sich nach wenigen Tagen selbständig terminieren oder aufgrund des unspezifischen Verlaufes unbehandelt über mehrere Wochen persistieren. Die Hospitalisationsrate liegt bei ungefähr der Hälfte aller erkrankten Patienten, welche meistens ein fortgeschrittenes Lebensalter aufweisen. Immunsupprimierenden Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus oder andere immunsupprimierende Zustände finden sich häufig. Die Letalität liegt bei ungefähr 1%. Hauptursachen sind septischer Schock, respiratorische Insuffizienz, opportunistische Infektionen, Rhabdomyolyse, Pankarditis, demyelinisierende Nervenläsionen oder Niereninsuffizienz (Bakken und Dumler 2000).

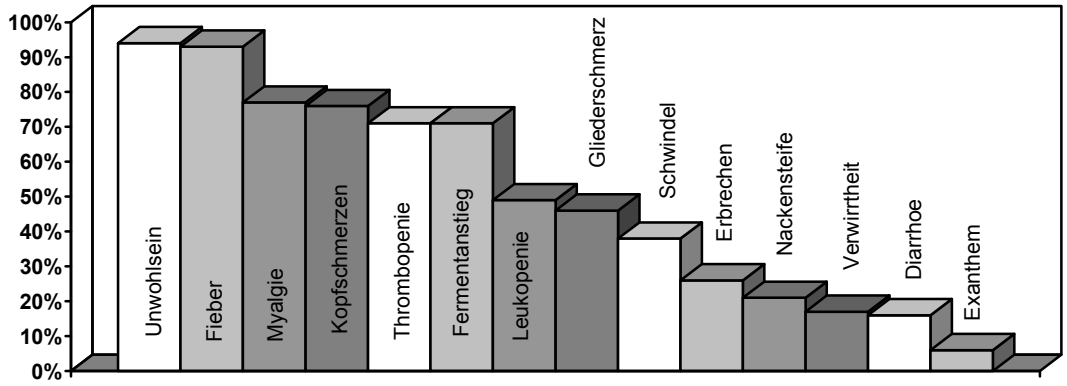


Abb. 2.2.

Auftreten von Symptomen einer Infektion mit *Anaplasma* spp. nach Häufigkeiten (in Prozent) nach (Dumler et al. 2007)

2.2.7. Diagnostik

Während der Anamnese und klinischen Untersuchung sollten Zeckenexpositionen und Exantheme besonders berücksichtigt werden. Imponieren hohes Fieber in Kombination mit typischen Blutbildveränderungen wie Thrombopenie, Leukopenie, CRP- Erhöhung oder Morulae im Blutausstrich sollte die Differentialdiagnose humane granulozytäre Anaplasmose in Erwägung gezogen werden. Viele Patienten haben einen zwei- bis vierfachen Anstieg der hepatischen Transaminasen, eine Erhöhung des C- reaktiven Proteins, sowie Blutbildveränderungen wie Thrombopenie und Leukopenie deren Nadir durchschnittlich am 7. Tag durchschritten wird. In der zweiten Krankheitswoche verändert sich die Leukopenie mit Linksverschiebung in eine Leukozytose (Lotric-Furlan et al. 2003).

Vor Beginn einer antibiotischen Therapie sollte unbedingt Patientenmaterial für die Durchführung von Mikroskopie und PCR zur Diagnosesicherung gewonnen werden (Aguero-Rosenfeld 2002).

Die gramnegativen Bakterien lassen sie sich mit der Gramfärbung nur unzureichend visualisieren, so dass eine Färbung nach Giemsa oder Leishman bevorzugt wird (Woldehiwet 2010). Aufgrund der zu Erkrankungsbeginn bestehenden Leukopenie empfiehlt sich die Betrachtung eines dicken Tropfens, welcher innerhalb der ersten 24 h nach Blutentnahme vor Eintritt einer lagerungsbedingten Zelllyse mikroskopiert werden sollte (Aguero-Rosenfeld 2002). Bei der mikroskopischen Betrachtung der neutrophilen Granulozyten imponieren intrazytoplasmatische Granula. Diese sind mehr getüpfelt, grober und dunkler gefärbt als die neutrophilen Granula. Es empfiehlt sich zwischen 800 bis 1000 Granulozyten auf Morulae zu beurteilen. Jedoch hängt ihr Auffinden wesentlich von der Erfahrung des Mikroskopierenden und dem Untersuchungszeitpunkt ab, da jenseits der ersten Erkrankungswoche Morulae seltener auftreten. Sie können in der ersten Erkrankungswoche durchschnittlich in 62% der Erkrankten nachgewiesen werden und befallen zwischen 0,1 bis 42% der neutrophilen Granulozyten (Thomas et al. 2009).

Die Möglichkeit der Untersuchung von Patientenmaterial mittels PCR oder Inokulation von HL-60- Zellen ist nur wenigen Zentren vorbehalten. Die meisten Kulturen werden nach einer Woche positiv und zeigen nach der Giemsa -Färbung in der Mikroskopie maulbeerartig geformte Vakuolen. Jedoch kann das Blut

infizierter Patienten auch zwei Wochen nach Inokulation negativ bleiben (Aguero-Rosenfeld 2002).

Für die PCR-Diagnostik stehen verschiedene Zielsequenzen zur Verfügung. Häufig werden Bereiche des 16S rDNA Gens amplifiziert, andere Genloci sind das *groESL operon* und das *epank-1* Gen. Die Vorteile der PCR sind vor allem die relativ hohe Sensitivität von 70 bis 75% in der akuten Phase, die Möglichkeit sie, im Gegensatz zur Zellkultur, auch nach Gabe geringer Dosen Antibiotika durchzuführen und die rasche Diagnosestellung (Dumler et al. 2007).

Serologische Testungen mit einem vierfachen Antikörperanstieg können ebenfalls zur Diagnostik verwendet werden. In 95% der Fälle kann die indirekte Immunfluoreszenz elf Tage nach Symptombeginn einen Antikörperanstieg mit IFA-Titern von über 640 erreichen. Die IgM Antikörper sind nur während der ersten 45 bis 50 Tage nachweisbar und nicht sensitiver als ein IgG-Anstieg. Sie können falsch positiv sein und mit Typhus, EBV, Q- Fieber, Rickettsiose, Brucellose, Lyme Borreliose oder Autoimmunerkrankungen interagieren (Dumler et al. 2007).

Nach Aguero- Rosenfeld et al. wird für die Bestätigung einer HGA bei klinischem Verdacht zusätzlich eines der folgenden Kriterien benötigt (Aguero- Rosenfeld 2002)

- vierfacher Anstieg des Antikörpertiters gegen *A. phagocytophilum* in der Immunfluoreszenz im Vgl. zur Voruntersuchung
- positive PCR und Bestätigung der *A. phagocytophilum* DNA
- Auffinden von Morulae in Leukozyten und positiver Antikörpertiter
- immunhistochemische Färbung von *A. phagocytophilum* in Gewebe-histologien
- kultureller Nachweis von *A. phagocytophilum* im Patientenmaterial . (Dumler et al. 2007).

Eine wahrscheinliche humane granulozytäre Ehrlichiose liegt vor bei

- einmalig erhöhtem Antikörpertiter in der Immunfluoreszenz > 80
- Auffinden von Morulae in Leukozyten ohne Antikörperanstieg (Dumler et al. 2007).

Die Sensitivität der diagnostischen Methoden stellte Dumler 2007 ebenfalls tabellarisch dar (siehe Tab. 2.2.). Es imponiert die Überlegenheit der PCR in der ersten Woche nach erfolgter Infektion. Im Verlauf ist jedoch die Serologie die sensitivste Methode, wobei jedoch apathogene Stämme zu falsch positiven serologischen Nachweisen führen können.

	1. WOCHE	2. WOCHE	3. WOCHE
Mikroskopie	25- 75%	63%	-
PCR	60- 85%	68%	-
Serologie	24- 44% IgG 33% IgM	91% IgG	> 95% IgG
Kultur	> 55%	33%	-

Tab. 2.2.

Darstellung der Sensitivität diagnostischer Methoden bezüglich einer Infektion mit *Anaplasma* spp. im Verlauf der Erkrankung nach (Dumler et al. 2007)

2.2.8. Therapie

Bei klinischem Verdacht auf eine HGA mit Blutbildveränderungen sollte unverzüglich eine antibiotische Therapie begonnen werden. Zwei bis vier Wochen nach Konvaleszenz besteht die Möglichkeit die Diagnose nachträglich mit Immunfluoreszenzfärbung der Antikörper zu bestätigen.

Finden sich initial keine laborchemischen Hinweise auf eine HGA sollte sich nach 24- stündiger Beobachtungsphase bei fortbestehenden klinischen Zeichen erneut eine Blutuntersuchung anschließen. Bei Besserung der klinischen Symptome, ist eine Beobachtung des Patienten bis zum Verschwinden der Symptome zu empfehlen (Bakken und Dumler 2000).

Als Antibiotikum der ersten Wahl gilt nach aktuellen Richtlinien in Deutschland und der USA Doxycyclin 100 mg zweimal täglich per os (p.o.). Alternativ stehen Tetracyclin 500 mg alle 6 h p.o. sowie Rifampicin 300 mg zweimal täglich p.o. zur Verfügung. Die Behandlung erstreckt sich über 7 bis 14 Tage (Dumler et al. 2007).

In-vivo Untersuchungen ergaben eine Unwirksamkeit von ß- Lactamen, Cephalosporinen, Makroliden und Aminoglykosiden. Für Levofloxacin existieren positive in-vitro Ergebnisse (Dumler et al. 2007).

2.2.9. Prophylaxe

Die wirkungsvollste Prophylaxe ist das Meiden von Zeckenhabitaten und Tragen heller, den Köper bedeckender Kleidung. Falls es zu einem Befall kommt, sollte die saugende Zecke innerhalb der ersten 24 Stunden entfernt werden, da erst danach der Erreger *A. phagocytophilum* effektiv übertragen werden kann (Katavolos et al. 1998).

2.3. *Rickettsia* spp.

2.3.1. Morphologie und Stoffwechsel

Alle Angehörigen der Gattung *Rickettsia* sind obligat intrazellulär lebende gram-negative Organismen, welche sich frei im Zytoplasma eukaryontischer Zellen aufhalten und eine dreischichtige Zellwand besitzten (Beati et al. 1993). Zur Energiegewinnung können sie zum einen ATP aus dem Zytoplasma der Wirtszelle nutzen, zum anderen über den Tricarbonsäurezyklus und oxydative Phosphorylierung ATP selbst synthetisieren (Roux et al. 1997).

Spottet fever group (SFG) Rickettsien replizieren in den Endothelien kleiner bis mittelgroßer Blutgefäße und verursachen dort eine Vaskulitits (Walker und Mattern 1980). Das *ompA* Gen von *R. rickettsii* erlaubt dem Pathogen die Adhäsion und Penetration der endothelialen Zellen. Intrazellulär lysieren sie das Phagolysosom, vermutlich über Phospholipase A_2 und dringen mit Hilfe von Actin- Polymerisation in den Nucleolus ein. Im Gegensatz zu den *SFG Rickettsiae* findet man *Typhus group* (TG) *Rickettsiae* ausschließlich im Zytoplasma (Parola et al. 2005).

2.3.2. Geschichte

Rickettsia spp. gehört zu den ersten bekannten durch Vektoren übertragenen Krankheitserreger. Erstmalig beschrieb 1899 E. Maxey die klinischen Zeichen des *Rocky- Mountain Spotted Fever* (Maxey 1899). 1906 erkannte Henry Ricketts die Bedeutung von *Dermacentor occidentalis* (Waldzecke) bei der Übertragung des Bakterium *R. rickettsii* (Ricketts 1906). 1910 wurde in Tunis das Rückfallfieber des Mittelmeeres erstbeschrieben (A Conor 1910) und 1932 entdeckte Brumpt *R. conorii* als ursächlichen Erreger (Brumpt 1932).

Die experimentellen Arbeiten von S. Wolbach erbrachten 1919 den Beweis für die Funktion von Zecken als Hauptreservoir für *R. rickettsii*, welche damals noch *Dermacentroxenus rickettsii* hießen (Wolbach 1919). In den nächsten Jahren wurden andere Spezies der Familie der *Rickettsia* entdeckt (1939 *R. parkeri*, 1963 *R. montanensis*, 1978 *R. rhipicephali,* 1979 *R. helvetica,* 2002 *R. monacensis*), welche zunächst als apathogen bewertet wurden (Simser et al. 2002, Parola et al. 2005).

2.3.3. Nomenklatur

Das obligat intrazellulär lebende Bakterium gehört zur Gruppe der α-Proteobakterien des Genus *Rickettsia* einem Mitglied der Familie Rickettsiaceae in der Gruppe der Rickettsiales. Historisch wurde die Ordnung der Rickettsiales in drei Familien unterteilt: den Rickettsiaceae, den Bartonellaceae und den Anaplasmataceae. Die Rickettsiaceae setzten sich aus den Stämmen der *Rickettsiae, Ehrlichiae* und *Wolbacheriae* zusammen wobei der Stamm der *Rickettsiae* aus den Gattungen *Coxiella, Rickettsia* und *Rochalimaea* bestand. Die Analyse der 16S rDNA ermöglichte die Ermittlung phylogenetischer Beziehungen zwischen den einzelnen Bakterien. Aufgrund dieser Untersuchungen werden *Coxiellae* und *Rochalimaeae* nicht mehr zur Gattung der *Rickettsiae* gezählt (Roux und Raoult 1995). Im Verlauf wurden zur phylogenetischen Analyse die rasch mutierenden Gene der Citrat- Synthase und des *OmpA* genutzt (Roux et al. 1997). Es existieren 21 anerkannte Spezies, welche in vier Gruppen aufgeteilt werden.

1. Ahnengruppe mit *R. bellii* und *R. canadensis*
2. Typhus- Gruppe mit der durch Flöhe übertragenen *R. typhii* und die durch Läuse übertragene *R. prowazekii*
3. Fleckfieber- Gruppe deren Vertreter hauptsächlich durch Zecken, jedoch auch durch Flöhe und Milben übertragen werden und die sich aus sieben Linien zusammensetzt.
4. Tsutsugamushi-Fieber Gruppe (*scrub typhus group)*

2.3.4. Reservoir

Angehörige der Familie der Ixodidae dienen den *Rickettsia* spp. als Reservoir, Vektoren und Amplifikatoren. *Rickettsia* spp. können nahezu alle Organe einer Zecke infizieren und sich in Ihnen vermehren (Brouqui et al. 2007). Einige *Rickettsia* spp., wie z.B. *R. conorii*, sind auf einen spezifischen Wirt angewiesen, wohingegen *R. rickettsii* mit unterschiedlichen Vektoren aus verschiedenen Gattungen assoziiert ist (Parola et al. 2005).

Die Verbreitung kann transstadiell und durch *Cofeeding* erfolgen. *R. helvetica* kann ebenfalls transovariell übertragen werden und für *R. rickettsii* ist eine sexuelle Weitergabe während der Paarung beschrieben (Hayes et al. 1980).

2.3.5. Epidemiologie

Die geographische Verteilung von *Rickettsia* spp. ist als Zoonose ähnlich der Verbreitung ihrer Wirte, so dass in den verschiedenen europäischen Regionen unterschiedliche Krankheitsbilder endemisch sind. Aktuell sind 32 Rickettsienspezies bekannt, von welchen zehn in Europa endemisch sind. In Deutschland wurden bislang nur *R. helvetica, R. monacensis, R. aeschlimanni, R. slovaca* und *R. felis* nachgewiesen (Parola et al. 2005) sowie *R. raoulti* (Dobler und Wölfel 2009). Die aufgeführte Liste charakterisiert die in Europa endemischen *Rickettsia* spp.

1. *R. conorii*, der Verursacher des Rückfallfiebers des Mittelmeeres, welcher durch den Biss der braunen Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus* übertragen wird. Er ist in den Mittelmeerländern, dem nahen und fernen Osten beheimatet und der häufigste Erreger einer Rickettsiose (Parola et al. 1998).
2. *R. sibirica*, als deren Vektoren *Dermatocenta* spp. dient und welche in Russland den sibirischen Zeckentyphus verursacht (Parola et al. 1998).
3. *R. slovaca,* der Verursacher des mitteleuropäischen Zeckentyphus, ist in Mitteleuropa und Armenien vertreten (Parola et al. 1998).
4. Am kaspischen Meer sind durch *Rhipicephalus pumilio* übertragene *Rickettsia* spp. für das Fieber von Astrakhan verantwortlich (Parola et al. 1998).
5. *Rickettsialpox* eine durch *R. akari* bedingte Erkrankung wird in Sibirien und der Ukraine durch den Mäuseparasiten *Allodermanyssus sanguineus* verbreitet (Parola et al. 1998).
6. *R. helvetica* existiert in Mitteleuropa, wird durch *Ixodes ricinus* übertragen und verursacht Vaskulitiden (Parola et al. 1998).
7. *R. raoulti* wurde in Spanien, Frankreich, Russland, Kroatien und Polen nachgewiesen. Die Pathogenität ist bislang noch ungeklärt (Chmielewski et al. 2009, Mediannikov et al. 2008).

8. *R. felis* wird vom Katzenfloh (*Ctenocephalides felis)* als bislang einzig bekanntem Vektor übertragen und sowohl in Zecken als auch Mäusen nachgewiesen. Beim Menschen verursacht *R. felis* einen fieberhaften Infekt mit Exanthem und Kopfschmerzen (Reif und Macaluso 2009).
9. *R. monascensis* wurde 2002 erstmalig in München nachgewiesen, die Pathogenität für den Menschen ist noch ungeklärt (Simser et al. 2002).
10. *R. aeschlimannia* verursacht einen fieberhaften Infekt mit maculo-papulärem Exanthem und *tache noire,* 2000 wurde die erste humane Infektion in Frankreich berichtet (Raoult et al. 2002).

2.3.6. Klinik

Im Menschen vermehrt sich *Rickettsia* spp. hauptsächlich in Gefäßendothelien und verursacht dort eine Vaskulitis mit gesteigerter Gefäßpermeabilität (Walker und Mattern 1980).

Eine Infektion mit *R. helvetica* verursacht eine fieberhafte Infektion mit grippalen Symptomen wie Muskel-, Kopf- und Gelenkschmerzen (Fournier et al. 2000). Laborchemisch imponieren Leukozytose, Thrombopenie und Erhöhung der Leberfermente (Fournier et al. 2004). Eine chronische Infektion mit *R. helvetica* im Perikard oder den Kapillaren der Lungenstrombahn kann die Bildung von Granulomen bedingen, welche zu akutem respiratorischem Versagen oder zur Ausbildung von tödlichen Herzrhythmusstörungen führen können (Nilsson et al. 2002).

In der Literatur sind Fälle von *R. helvetica* assoziierter Perimyokarditis (Nilsson et al. 1999b), Valvulitiden (Nilsson et al. 2005) sowie Sarkoidose (Nilsson et al. 2002) beschrieben. Eine Studie mit geringer Fallzahl widerspricht hingegen einer Assoziation von Sarkoidose und einer Infektion mit *R. helvetica* (Planck et al. 2004).

Eine Infektion mit *R. monacensis* verläuft ähnlich wie das mediterrane Fleckfieber. Die Patienten leiden unter hohem Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, maculopapulösem Exanthem sowie einem Eschar der Eintrittstelle. Laborchemisch imponiert v. a. eine Thrombozytopenie (Jado et al. 2007).

2.3.7. Diagnostik

Als einfachste diagnostische Möglichkeit zum Nachweis einer Rickettsiose gilt die Serologie mit einem mindestens vierfachen Titeranstieg innerhalb von zwei Wochen. Die Weil- Felix- Reaktion, in welcher man die Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen *Rickettsia* spp. und Antikörpern gegen Lipopolysaccharide von *Proteus vulgaris* OX19 sowie OX2 nutzt, gilt als der älteste serologische Test. Durch unterschiedlich starke Kreuzreaktivität mit den Proteusstämmen gelingt die Differenzierung von *SFG* (OX2) und *TG Rickettsia* (OX19) (Weil 1916). Aufgrund der niedrigen Sensitivität wurde diese Methode 1978 von der Mikroimmunfluoreszenz, welche jedoch ebenfalls eine starke Kreuzreaktivität und damit niedrige Spezifität aufweist, ersetzt (Philip et al. 1978). In der Mikroimmunfluoreszenz werden hochmolekulare Oberflächenmarker (*OmpA, OmpB* und *PS120*) mit Spezies- spezifischen Epitopen für die serologische Diagnostik bei Verdacht auf Rickettsiose verwendet (La Scola und Raoult 1997). Diese Methode ermöglicht eine Differenzierung zwischen IgG und IgM-Antikörpern. Nach einer Empfehlung der *Unité des Rickettsies* beweist beim Vorhandensein klinischer Symptome ein IgG- Titer von mehr als 128 und/ oder ein IgM- Titer von mehr als 64 eine Infektion mit *R. conorii*. Bei klinischem Verdacht auf eine Rickettsiose und niedrigeren serologischen Antikörpertitern sollte an eine andere Spezies der *Rickettsia* spp. gedacht werden. Beide Antikörperklassen kann man jedoch erst 7 bis 15 Tage nach Ausbruch der Erkrankung serologisch nachweisen (Brouqui et al. 2007).

Die Western- Blot- Methode dient als Bestätigungstest und kann falsch positive Befunde, welche durch eine meist gegen Lipopolysaccharide gerichtete Kreuzreaktivität entstehen, herausfiltern. Eine sehr aufwendige Nachweismethode ist die Anzucht von *Rickettsia* spp. in Zellkulturen, wofür Vero-Zellen, embryonierte Hühnereier oder Meerschweinchenhoden verwendet werden können (Brouqui et al. 2007).

Am weitesten verbreitet ist die Durchführung einer PCR aus Biopsien, EDTA-/ Citratblut oder aus Zecken. Als Template werden hierzu die Gene von Citratsynthase, *OmpA* und 16S- DNA benutzt (Brouqui et al. 2007).

Laborchemisch findet man in zwei Dritteln der Fälle unspezifische Veränderungen wie Thrombozytopenie, Leberfermentanstieg und Leukozytose (Fournier et al. 2004).

2.3.8. Therapie

Als Antibiotikum der ersten Wahl gilt in Deutschland und den USA Doxycyclin 100 mg zweimal täglich p.o. (Kinder > 8 Jahre 2mg/kgKG) über 7 bis 10 Tage. Als wirksame Alternativen gelten Fluorchinolone, Rifampicin und Thiamphenicol (Rolain et al. 2002).

Für Schwangere und Kinder unter 8 Jahren empfiehlt sich Clarithromycin 7,5 mg/ kgKG zweimal täglich über 7 Tage.

Als wirkungslos haben sich ß- Laktame, Erythromycin und Trimethoprim/ Sulfamethoxazol erwiesen (Rolain et al. 1998).

2.3.9. Prophylaxe

Das Meiden von Zeckenhabitaten stellt selbstverständlich die wirkungsvollste Art der Prophylaxe dar, da *Rickettsia* spp. hauptsächlich durch Arthopoden übertragen werden. Eine weitere präventive Maßnahme stellt die Untersuchung von Blutprodukten auf Kontamination mit *Rickettsia* spp. dar. Bislang konnte jedoch nur ein einziger Fall einer transfusionsbedingten Infektion mit *R. rickettsii* sicher bestätigt werden. Der Empfänger dieses Blutproduktes verstarb sechs Tage nach Erhalt der Transfusion (Wells et al. 1978).

Die CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) empfiehlt einen vierwöchigen Verzicht auf Blutspenden nach erhöhter Expositionswahrscheinlichkeit (z.B. Militärausbildung) (Arguin et al. 1999) sowie die Verwendung von Leukozyten- depletierten Blutprodukten (Mettille et al. 2000).

In Deutschland wurde eine solche Empfehlung bisher noch nicht ausgesprochen.

Bezüglich der in der Literatur beschriebenen Verbreitung durch Aerosole bestehen widersprüchliche Aussagen, so dass hierzu keine Stellungnahme möglich erscheint (Oster et al. 1977).

3. ZIELE DER ARBEIT

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollen epidemiologische Daten bezüglich der Prävalenz von *Anaplasma* spp. und *Rickettsia* spp. in Thüringen gewonnen werden.

Diese humanpathogenen Bakterien können letal verlaufende fieberhafte Erkrankungen verursachen und werden dennoch differentialdiagnostisch kaum bedacht. Diese Arbeit möchte die Verbreitung dieser durch *Ixodes ricinus* übertragenen Erreger in ihren Vektoren ermitteln und somit als Grundlage für die Gefahrenbewertung dienen. Sie soll expositionsgefährdete Menschen sowie praktizierende Ärzte auf diese Erreger sensibilisieren. Ein nächster Schritt wären weiterführende serologische Untersuchungen exponierter Bevölkerungsgruppen.

Thüringen gilt als Endemiegebiet für FSME und Borreliose, was auf ein ausreichendes Vorhandensein von passenden Vektoren und Wirtstieren schließen lässt. Diese bekannten Daten sollen nun durch epidemiologische Daten zweier weiterer zeckenübertragbarer Erreger, *Anaplasma* spp. und *Rickettsia* spp., bereichert werden.

Außer den Einzelinfektionen ist gerade der Nachweis von Koinfektionen in *Ixodes ricinus* interessant und bedeutsam, da sowohl die Diagnose erschwert wird, als auch die Erkrankung komplikationsreicher verlaufen kann. In der vorliegenden Arbeit wurden Koinfektionen von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp. untersucht.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Prävalenz der beiden genannten Erreger in *Ixodes ricinus* vor dem Hintergrund jahreszeitlicher Schwankungen, sowie Entwicklungsstadien der Zecken.

Anhand der vorliegenden Dissertation konnte erstmalig *Rickettsia* spp. in Thüringen nachgewiesen wurde, so dass diese Arbeit als Grundlage für weiterführende Untersuchungen von *Rickettsia* spp. dient.

Sollte eine relevante Prävalenz von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp. ermittelbar sein, wäre dies ein Anstoß für die Entwicklung verlässlicherer diagnostischer Test, welche bislang noch nicht standardisiert vorhanden sind.

4. METHODIK

4.1. Allgemeine Methoden

4.1.1. Sammeln der Zecken

Die zu untersuchenden Zecken wurden im Zeitraum Mai 2006 bis Oktober 2006, sowie von April 2007 bis September 2007 gesammelt. Sammelort war der Zeitzgrund, ein Naherholungsgebiet zwischen Jena und Gera, welches häufig für Ausflüge und sportliche Aktivitäten genutzt wird. Wiesen und belaubter Waldrand entlang der stark frequentierten Wanderwege wurden als Sammelorte ausgewählt. Es herrscht ein gemäßigtes Klima mit einer Jahresdurchschnittstemperatur von 10°C und einer Niederschlagsmenge von 595,6 mm im Jahr 2006 und 736,7 mm im Jahr 2007 (Wetterdienst Thüringen, www.dwd.de). Die nüchternen Zecken wurden mit weißen Laken vom Wegesrand in unterschiedlicher Fanghöhe aufgelesen. Diese Methode ist als *flagging* oder *dragging* in der Literatur beschrieben (Fourie et al. 1995). Zweimal pro Monat wurden in der Mittagszeit an trockenen Tagen dieselben Fangorte aufgesucht. Die aufgelesenen *Ixodes ricinus* Zecken wurden mit einer Pinzette in je ein 1,5 ml fassendes Eppendorftube überführt. Bis zur Aufarbeitung wurden diese bei -80°C gelagert. Protokolliert wurden Fangdatum, Geschlecht und Entwicklungsstadium. Die Anzahl der gesammelten *Ixodes ricinus* Zecken ist in den Tabellen 4.1.1. und 4.1.2. aufgeführt. Auf eine annähernde Gleichverteilung der Entwicklungsstadien wurde geachtet.

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

Tab. 4.1.1.

Anzahl der gesammelten Zecken 2006 unterteilt in Monat und Entwicklungsstadium

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

Tab. 4.1.2.

Anzahl der gesammelten Zecken 2007 unterteilt in Monat und Entwicklungsstadium

4.1.2. DNA Extraktion aus der Zecke

Zur DNA Extraktion diente das *High Pure PCR Template Preparation Kit* der Firma Roche. Um an die Erreger- DNA, welche in den Speicheldrüsen der Zecken vermutet wurden zu gelangen, mussten die adulten Tiere mit Pinzette und Schere auf sterilen Plastikschalen zerteilt werden. Bei den Nymphen eignete sich das Zerquetschen der Tiere mit einem speziellen Pistill besser um die geringen DNA Konzentrationen zu präparieren. In die Eppendorftubes wurden je 200 µl PBS (*phosphated buffered saline*), 200 µl *Lysis Buffer* und 40 µl Proteinase K (20 mg/ ml) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 55°C im Thermoblock.

Zum Nachweis eines sauberen Extraktionsvorganges wurde PBS als Negativkontrolle bis einschließlich zur PCR mitgeführt.

Anschließend wurden 200 µl *Binding Buffer* hinzugegeben, gründlich resuspendiert und bei 72°C für 10 min in einem Thermovortex- Gerät geschüttelt. Nach dem Pipettieren von 100 µl Isopropanol konnte der Reagenzansatz in den oberen Teil eines *High Pure Filter Tube* überführt werden. Der Bindungspuffer verhindert, dass die DNA bei der nun folgenden zweiminütigen Zentrifugation bei 8000 rpm (5375 x g) aus dem Filter herausgespült wird. Das Diluat im Auffangtube wurde verworfen, das Filtertube auf einen frischen Untersatz gesetzt. Zur DNA im Filtertube gaben wir 500 µl *Inhibitor Removel Buffer*, um eine Kontamination der DNA mit PCR hemmenden Substanzen zu verhindern. Nach der Zentrifugation des Ansatzes bei 8000 rpm (5375 x g) wechselten wir erneut das Auffangtube. Hierauf folgte ein zweischrittiger Waschvorgang mit je 500 µl *Wash Buffer*, anschließender Zentrifugation und Tubewechsel. Die nun aufgereinigte DNA konnte aus dem

Filtertube mit 200 µl 72°C warmen *Elution Buffer* in neue 1,5 ml Tubes eluiert werden. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde der Ansatz nach Zugabe des Elutionspuffers für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor er zentrifugiert wurde. Die Konzentration der so gewonnenen DNA bestimmten wir stichprobenartig photometrisch. Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei – 20°C.

4.1.3. Photometrische Reinheitsmessung der extrahierten DNA

Die Bestimmung der DNA- Konzentration per Photometer erfolgt anhand des Gesetztes von Lambert- Beer. Dieses besagt, dass sich bei gleicher Schichtdicke die Extinktion proportional zur Konzentration der zu untersuchenden Substanz verhält (Bouguer 1729).

Extinktion = molarer Extinktionskoeffizient x Schichtdicke x Konzentration des zu untersuchenden Agens

Zur Absorptionsmessung wird UV- Licht der Wellenlänge 260 nm und 280 nm benutzt, da Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteine bei 280 nm ihr Absorptions-maximum aufweisen. Die gemessenen Absorptionswerte werden miteinander ins Verhältnis gesetzt, liegt der Quotient OD_{260}/ OD_{280} zwischen 1,8 und 2 handelt es sich um reine DNA, liegt er darunter geht man von einer Verunreinigung mit Proteinen aus. Die DNA- Konzentration wird mit der Formel nach Sambrook berechnet, wobei man für doppelsträngige DNA mit einer OD_{260} von 1 eine Referenzkonzentration von 50 µg/ ml zugrunde legt (Sambrook 1989)

DNA- Konzentration = OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 50 (µg/ ml)

Aufgrund der nur geringen uns zur Verfügung stehenden Menge an DNA konnte die Verdünnung (meist 1: 40) nicht durchgeführt werden, welche eine DNA-Konzentration der Probe von 2,5- 50 µg/ ml voraussetzt. Die DNA- Konzentration wurde mit Hilfe eines im Photometer integrierten Näherungsalgorithmus berechnet. Desweiteren benutzten wir die Photometrie zum Reinheitsnachweis der extrahierten DNA um frühzeitig einen systematischen Fehler durch z. B. Proteinverunreinigung erkennen zu können.

4.1.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von DNA. Der zu amplifizierende Abschnitt (*Template*) sollte maximal 3000 Basenpaare lang sein und benötigt zwei flankierende Abschnitte mit bekannter Basensequenz zur Anlagerung der Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer. Ebenfalls erforderlich sind: eine hitzestabile Polymerase, Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), Pufferlösung und die für die Polymerase essentiellen Magnesiumionen (Mullis et al. 1986).

In vitro wird die PCR in drei Teilschritte unterteilt:

1. Denaturierung des Doppelstranges: durch Erhitzung der DNA auf 94°C kommt es zu einer Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen und die Erbsubstanz liegt in Einzelsträngen vor.
2. *Annealing*: Die Temperatur wird erniedrigt, so dass sich die Primer spezifisch an ihre komplementären Basenpaare anlagern. Die optimale Temperatur bedingt sich sowohl aus Länge als auch Basensequenz der verwendeten Primer. Wird sie zu niedrig gewählt entstehen unspezifische Banden, ist sie zu hoch kann keine Ausbildung von Wasserstoff-brückenbindungen gelingen. Die passende Annealingtemperatur zum jeweiligen Primer haben wir unter http://www.promega.com/biomath/calc11.htm ausgewählt.
3. Amplifikation: eine hitzestabile Taq- Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wurde, lagert sich an das 3´- Ende des Primers und bindet komplementäre Nukleotide an die zu amplifizierende DNA- Matrize. Dies bedingt, dass sich der Rückwärtsprimerr in die 5´ zu 3´ Richtung anlegt und der Vorwärtsprimer in die 3´ zu 5´- Richtung. Unter Verwendung der optimalen Arbeitstemperatur (68- 72°C) können innerhalb 1 Minute ungefähr 1000 Basenpaare miteinander verknüpft werden.

Diese drei Arbeitsschritte werden mehrfach wiederholt und es kommt zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Templates (Mullis et al. 1986).

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit alle Schritte in separaten Räumen, die Anfertigung des Mastermix unter einer sterilen Werkbank, durchgeführt.

4.1.5. Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Trennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe. Die langen Agarosefäden werden nach Erkaltung zu einem Gel vernetzt, je höher die Konzentration der Agarose gewählt ist, desto kleiner sind die Poren (Gurvich et al. 1967).

Die aufgrund ihrer Glucose- Phosphat- Gruppen negativ geladene DNA bewegt sich entlang eines elektrischen Gradienten in Richtung Anode, wobei sich kleine Moleküle rascher als große und Plasmide schneller als lineare DNA durch das Sieb aus Agarose bewegen. Eine Erhöhung der angelegten elektrischen Spannung beschleunigt die Trennung der Nukleinsäuren. Die durch die elektrische Spannung entstehende Wärme kann das Gel zum Schmelzen bringen, so dass die Wahl der Stromspannung limitiert bleibt (Gurvich et al. 1967).

Die Visualisierung der Banden erfolgt im UV- Licht, in welchem *Sybr green,* sofern es mit Nukleinsäuren interkalierte, fluoresziert. Anhand eines Markergemisches mit bekannter Länge der Basenpaare kann die Größe der untersuchten Nukleinsäuren ermittelt werden (Voytas 2001).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit einem 2%-igem Agarosegel durchgeführt. Es wurden 5 µl des PCR Produktes zusammen mit 5 µl Orange G in eine Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurden ein DNA- Marker mit bekannten Fragmentlängen, die Positiv- sowie die Negativkontrolle der PCR mitgeführt. Das Gel wurde unter UV- Licht mit einer Wellenlänge von 300 nm visualisiert und die positiven Banden herausgeschnitten und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

4.1.6. Restriktionsverdau

In einem Restriktionsverdau werden Nukleinsäuren enzymatisch gespalten. Die verwendeten Enzyme lagern sich an komplementäre Basenpaare der zu untersuchenden DNA an und spalten sie nur an diesen spezifischen Orten (Roulland-Dussoix und Boyer 1969). Voraussetzung für einen Restriktionsverdau ist die Kenntnis der Basensequenz der zu verdauenden DNA und Auswahl eines Restriktionsenzyms, welches in diesem Bereich schneidet. Die DNA inkubiert gemeinsam mit dem spezifischen Restriktionsenzym und einer Pufferlösung Daraufhin wird der Reaktionsansatz gelelektrophoretisch visualisiert und sollte bei positivem Resultat anstelle einer mindestens zwei Banden bekannter Größe zeigen.

In dieser Arbeit konnten die Amplifikate sowohl der 16S rDNA von *Anaplasma phagocytophilum* als auch des Citratsynthase- Gens von *Rickettsia* spp. mit dem Restriktionsenzym *Ssp*I geschnitten werden. 5 µl Amplifikat wurden mit 1 µl *Ssp*I und 10 µl *Buffer G* über eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 2%igem Agarosegel.

4.1.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung ist eine molekularbiologische Methode zur Bestimmung der Nukleotidabfolge in einem DNA Molekül. Meist wird die Kettenabbruch- Methode nach Sanger verwendet. Ein Primer lagert sich komplementär an eine bekannte Basensequenz und eine DNA- Polymerase verlängert den Komplementärstrang mit im Reaktionsansatz vorhandenen fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Unter den Nukleotiden besitzen einige keine 3´- Hydroxy- Gruppe, so dass nach deren Einbau eine Verlängerung des Komplementärstranges durch die DNA-Polymerase unmöglich ist. Somit entstehen DNA- Fragmente unterschiedlicher Länge die anschließend mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Ein Laser regt das letzte Nukleotid jedes DNA Stranges an es fluoresziert je nach Base in unterschiedlicher Wellenlänge. Ein Detektor fängt diese Emissionen auf und stellt sie als Chromatogramm dar. Die ermittelte Sequenz kann mit bekannten Sequenzen der Gendatenbank verglichen und einer Spezies zugeordnet werden (Sanger et al. 1977).

In der vorliegenden Arbeit fällten wir das Gel für die ersten Sequenzierungen mit der Cholorphorm- Phenol- Extraktion. Diese Methode wurde später verlassen und wir arbeiteten mit einem weniger zeitaufwendigen Agarose Gel Extraktionskit.

Chlorophorm- Phenol- Fällung

Mit einem sterilen Pistil zerstießen wir zunächst das Gel, bevor es mit 150 µl Phenol bedeckt und bei -80°C für zwei Stunden gekühlt wurde. Anschließend zentrifugierte das erkaltete Gel für 20 min mit 14000 rpm (15400 x g), so dass sich eine klare flüssige Schicht über dem Gel bildete. Diese wurde mit einer Pipette entfernt und in ein steriles Eppendorftube zusammen mit 150 µl Isoamyl pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm (15400 x g) über fünf Minuten konnte der Überstand nach Zugabe von 150 µl Isoamyl/ Isoamylalkohol (im Verhältnis 24/ 1) in ein steriles Tube überführt werden. Nach nochmaliger fünfminütiger Zentrifugation wurde die klare Phase in ein neues Tube pipettiert und mit 10 µl Natriumacetat gemischt. Dieses Tube füllten wir mit DEPC- Wasser auf bis es 100 µl enthielt. Daraufhin wurden 250 µl Ethanol (100%) hinzugefügt und der Ansatz für 30 min bei -20°C gekühlt. Das Reaktionsgemisch zentrifugierte für 15 min bei 4°C mit 15000 rpm (16100 x g) und der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Im Tube verblieb nun die in 100% Ethanol gelöste DNA, diese versetzten wir mit 250 µl 70% Ethanol und lagerten sie für 30 Minuten bei -20°C. Nach zehnminütiger Auftrennung in der Kühlzentrifuge mit 15000 rpm (16100 x g) wurde erneut der Überstand verworfen. Neben der zu extrahierenden DNA befanden sich noch Ethanolreste im Tube, welche nach Zentrifugation für 15 min in der Trockenzentrifuge verflüchtigten. Die zurückbleibende DNA wurde bei 95°C über fünf Minuten mit 20 µl *Template Suppression Reagent* vermischt und anschließend für fünf Minuten auf Eis inkubiert.

Agarose Gel Extratkionskit

Die Gelbande vermischten wir mit 400 µl Extraktionspuffer bei 60°C über zehn Minuten bis sich eine klare Lösung bildete. Diese pipittierten wir in ein Filtertube und zentrifugierte sie mit 10000 rpm (8400 x g) eine Minute lang. Der Filter wurde erneut auf das geleerte Tube gesetzt und nach Zugabe von 500 ml Waschpuffer unter gleicher Bedingung zentrifugiert. Das Auffangtube wurde geleert, der Filter gleichsam aufgesetzt und mit 750 µl Waschbuffer befüllt. Es wurde erneut unter

oben genannter Bedingung zentrifugiert. Wir setzen nun den Filter auf ein neues Tube, gaben 30 µl DEPC- Wasser hinzu und inkubierten diese über eine Minute mit der im Filter befindlichen DNA. Nach erneuter Zentrifugation befand sich nun die gelöste DNA gemeinsam mit DEPC Wasser im Tube. Dieses Gemisch konnte anschließend in der Trockenzentrifuge auf 10 µl konzentriert werden.

Sequenz- PCR

Es wurden 5 µl der extrahierten DNA als Template eingesetzt.

PCR- Ansatz:	PCR- Protokoll:	
4 µl BigDye	20 s 94°C	
1 µl Primer	15 s 55°C	25 Zyklen
5 µl DNA	60 s 60°C	

Das gewonnene Amplifikat wurde in den Sequenzer eingesetzt und die gewonnene Sequenzanalyse nachfolgend mittels clustalW (*www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2/index.html*) ausgewertet und mit der NCBI Datenbank (*www.ncbi.nlm.nih.gov/blast*) verglichen.
Als Beispiel stellen Abb. 9.1.4. und 9.1.5. (siehe Seite 89 und 90) das Resultat einer Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese von aus einer unserer Zecken isolierten *Anaplasma* spp. dar, welche sich nach Auswertung der Basenfolge eindeutig der Spezies *Anaplasma phagocytophilum* zuordnen lies.

4.1.8. Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel 2007 sowie SPSS 10.0 durchgeführt. Zur Bestimmung der Signifikanz der Prävalenz der untersuchten Zecken wurde der *Chi- Quadrat- Test* verwendet, da es sich um dichotome Variablen handelt.
Als signifikant wurde $p < 0,05$ angesehen. Die Berechnung des 95% Konfidenzintervalls wurde mit dem Programm von Clopper und Pearson durchgeführt (Clopper CJ 1934).

4.2. Untersuchung der Zecken auf *Anaplasma phagocytophilum*

Zum Nachweis von *Anaplasma* spp. wurde ein Teil der 16S rDNA aus dem vollständigen Genom jeder einzelnen Zecke amplifiziert. Hierzu wurden die Primer Ap16 S1v und Ap16 S1r in Anlehnung an das Protokoll von A. Hildebrandt (Hildebrandt et al. 2002) verwandt, deren Sequenzen in Tabelle 4.2.1. aufgeführt sind. Zeigten sich in der Gelektrophorese Nukleinsäuren mit einer Größe von 944 bp, wurden entweder die Amplifikate bzw. die aus dem Gel geschnittene DNA sequenziert oder ein Restriktionsverdau des Amplifikates durchgeführt.
Jeder PCR-Ansatz enthielt eine Positivkontrolle, eine Negativ- PBS- Kontrolle und eine Negativ- Aqua destillata- Kontrolle. Die PBS- Kontrolle stammte aus der DNA- Extraktion der Zecken und sollte eine Kontamination während dieses Arbeitsprozesses ausschließen. Die *Aqua destillata*- Kontrolle diente als Sicherung einer sauberen Arbeitsweise während der PCR. Als Positiv- Kontrolle diente isolierte DNA, welche uns U. Munderloh (Associate Professor, Department of Entomology, University of Minnesota) zur Verfügung stellte.

<u>Master- Mix:</u>

4 µl	dNTPs je 2,5 mM	Anfertigung des Master-Mix an der Sterilbank
5 µl	10x Puffer mit $MgCl_2$ und KCl	
0,5 µl	Ap 16S 1v	
0,5 µl	Ap 16S 1r	
0,25 µl	Taq Polymerase	
30,75 µl	DEPC- Wasser	

5 µl DNA, PBS oder *Aqua dest*.

Primer	Sequenz
Ap16 S1v	5'- CAA GCT TAA CAC ATG CAA GTC GAA C-3'
Ap16 S1r	5'- CCC TTC CGT TAA GAA GGA TCT AAT C-3`

Tab. 4.2.1.

Primersequenzen (Hildebrandt et al. 2002) zum Nachweis von *Anaplasma* spp.

A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymidin

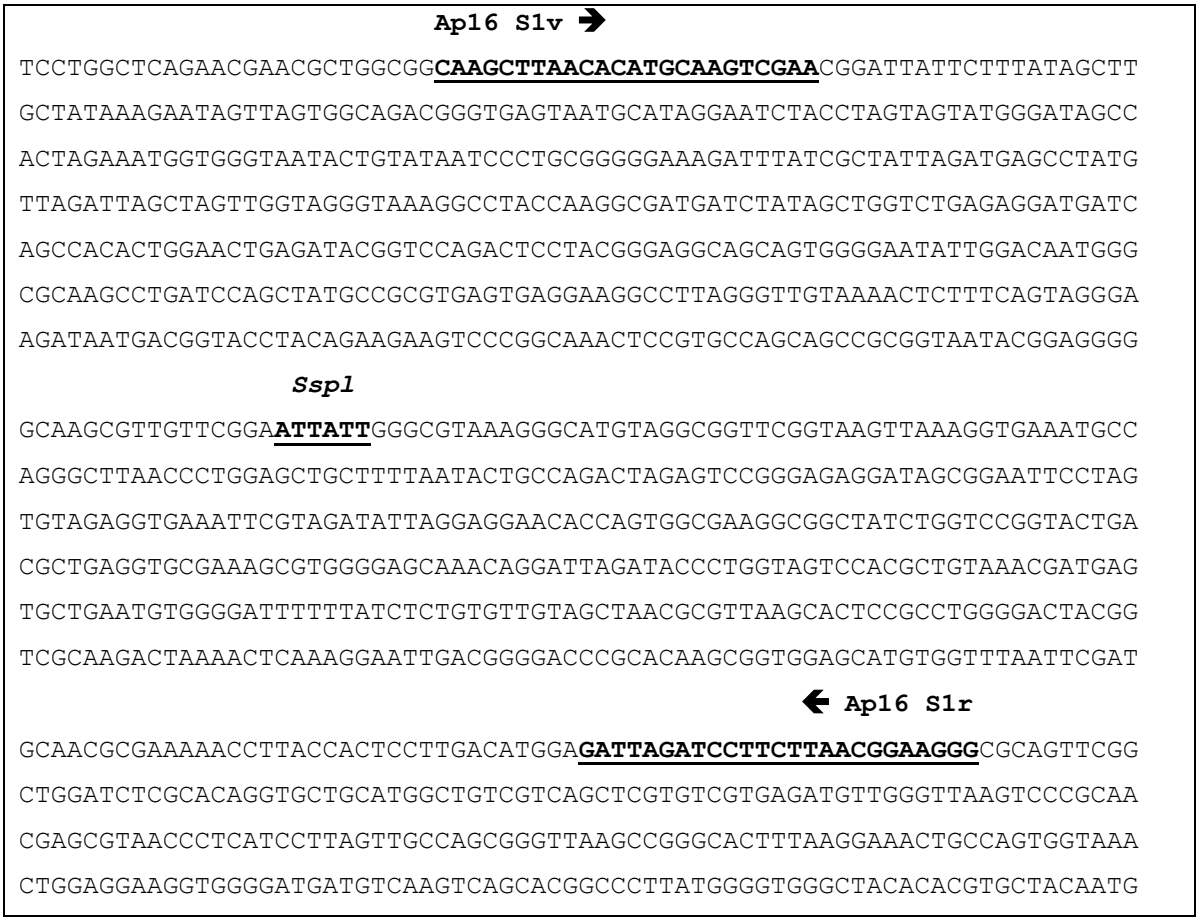


Abb. 4.2.1

Vollständige Sequenz der C- und D- Untereinheit der Succinatdehyrogenase auf dem ribosomalen 16S rDNA Gens von *Anaplasma phagocytophilum*. Die eingezeichneten Primer Ap16 S1v und Ap16 S1r amplifizieren die 16S rDNA (*www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Ssp*I kennzeichnet die Schnittstelle des Restriktionsenzyms. A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymidin

PCR- Protokoll zum Nachweis von *Anaplasma* spp.:

Initiale Denaturierung	94°C, 5min	
Denaturierung	94°C, 5min	40 Zyklen
Annealing	56°C, 1min	
Extension	72°C, 1min	
Finale Extension	72°C, 7min	

.

Zur Trennung der PCR- Amplifikate wurde ein 2%iges Agarose Gel (2 g Agarose auf 100 ml TAE) erhitzt und nach Zugabe von *Sybr- green* in die Gelkammer gegossen. 1x TAE diente als Laufpuffer und die PCR Produkte wurden mit Orange G markiert, um sie anschließend unter UV- Licht beurteilen zu können.

Als potentiell positiv wurden Banden in Höhe von 944 bp bewertet, welche anschließend mit Restriktionsverdau oder Sequenzierung weiter analysiert wurden. Der Restriktionsverdau wurde mit dem Enzym *SspI* durchgeführt. *SspI* schneidet DNA mit folgender Sequenz: ATT ^ ATT. In der Gelektrophorese ergaben sich nach erfolgreichem Restriktionsverdau Produkte der Größe 633 bp und 311 bp. Die Zielsequenz ist in Tab. 4.2.2. eingezeichnet.

RESTRIKTIONSENZYM	RESTRIKTIONSORT
SspI	5'- AAT ^ATT – '3 3'- TTA ^TAA – '5

Tab. 4.2.2.

Zielsequenz des Restrikionsenzyms *SspI* und dessen Schnittstelle (mit ^ markiert)

4.3. Untersuchung der Zecken auf *Rickettsia* spp.

Zum Nachweis von *Rickettsia* spp. wurde ein Abschnitt des Citratsynthasegens (*gltA*) amplifiziert. Der PCR Ansatz wurde 1999 von Nilsson et al. beschrieben (Nilsson et al. 1999a) und besteht aus:

Mastermix:

4 µl	dNTPs je 2,5mM	Anfertigung des Master-Mix an der Sterilbank
5 µl	10x Puffer mit $MgCl_2$ und KCl	
0,5 µl	RH 314	
0,5 µl	RH 654	
0,25 µl	Taq Polymerase	
30,75 µl	DEPC- Wasser	

5 µl DNA, PBS oder *Aqua dest*.

Ulrike Munderloh aus Minnesota stellte uns DNA von *Rickettsia monascensis* als Positivkontrolle zur Verfügung. Als Negativkontrolle für die Kontrolle der Sauberkeit der PCR diente *Aqua destillata*. Desweiteren wurde eine Probe PBS, welche als Negativkontrolle der DNA- Extraktion diente, mitgeführt.
Dieser im Sterilraum gefertigte Ansatz durchlief den PCR Cycler unter folgenden Bedingungen:

PCR- Protokoll für *Rickettsia* spp.:

Initiale Denaturierung	94°C, 5 min	
Denaturierung	94°C, 30 sec	40 Zyklen
Annealing	54°C, 30 sec	
Extension	72°C, 1,3 min	
Finale Extension	72°C, 7 min	

Primer	Sequenz
RH 314 vorwärts	5`- AAA CAG GTT GCT CAT CAT TC-3`
RH 654 rückwärts	5`- AGA GCA TTT TTT ATT ATT GG- 3`

Tab. 4.3.1.

Primersequenzen zum Nachweis von *Rickettsia* spp. (Nilsson et al. 1999a)

TGATTCAGAATTTGCCGAGTTAAAAATCAGAGGAAAAATATTTAAATTACCGATACTTAAAGCAAGTATC
GGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCAGAAGCCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGCTTTA
TGTCTACTGCTTCTTGTCAATCTACTATCACCTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGG
ATATGATATTAAAGATTTAGCTGAAAAAAGTGATTTTTTAGAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAA

RH 314 →

CTACCAAGTAGCGAGCAGTATAATAATTTCACT**AAACAGGTTGCTCATCATTC**ATTAGTGAATGAAAGAT

SspI

TAC**ATTATT**TATTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTC
TCTTTCGGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCAGACTACGAACTTACCGCTATTAGAATG
ATTGCTAAGATACCTACTATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGGCAACCGTTTATTTATCCTG
ATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTACAACGCATTGTACGAAATATAAAGT

← RH 654

AAAT**CCAATAATAAAAAATGCTCT**TAATAAGATATTTATCCTACATGCAGACCATGAGCAGAATGCTTCT
ACCTCAACAGTTCGAATTGCCGGCTCATCCGGAGCTAACCCTTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCT
CACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTC
TGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATGGGTTTTGGT

Abb. 4.3.1

Sequenz des Citrat Synthase (*gltA*) Gens von *Rickettsia monacensis* IrR/Münchner Stamm. Die eingezeichneten Primer RH 314 und RH 654 amplifizieren einen Teil des *gltA* Gens (*www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).* Der Restriktionsort von *SspI* ist eingezeichnet.

A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymidin

Zur Trennung der PCR- Amplifikate wurde ein 2%iges Agarose Gel (2 g Agarose auf 100 ml TAE) erhitzt und nach Zugabe von *Sybr- green* in die Gelkammer gegossen. 1x TAE diente als Laufpuffer und die PCR Produkte wurden mit Orange G markiert um sie anschließend unter UV- Licht beurteilen zu können. Als potentiell positiv wurden Banden in Höhe von 340 bp bewertet. Als Bestätigung wurden sowohl ein Restriktionsverdau als auch eine Sequenzierung der positiven Amplifikate durchgeführt. Nach dem Restriktionsverdau des aus 340 Basenpaaren bestehenden Amplifikates mit dem Enzym *SspI*, welches AAT ^ ATT schneidet, entstehen Produkte der Größe 217 bp und 123 bp. Die Zielsequenz des Restriktionsenzyms ist in Abb. 4.3.1. gekennzeichnet, die Schnittstelle in Tab. 4.2.1 aufgeführt.

4.4. Untersuchung der Zecken auf weitere Erreger

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit auf *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp. geprüften Zecken wurden in einer weiteren Dissertation auf die Prävalenz von *Borrelia* spp. und *Babesia* spp. untersucht (Paulicks 2009).
Hildebrandt und Kollegen analysierten die extrahierte DNA auf weitere Erreger, um die Prävalenz von Koinfektionen in *Ixodes ricinus* Zecken in Thüringen nachzuweisen (Hildebrandt 2011a, Hildebrandt et al. 2010b).

4.4.1. *Babesia* spp.

Die 18S- rRNA wurde mit Hilfe der Primer Bab 18S fw und Bab 18S rev nach dem Protokoll von Hartelt et al. (2004) amplifiziert. Als Bestätigung der PCR fand eine Restriktionsanalyse oder die Amplifikation eines anderen Zielbereiches der 18S rRNA mit den Primern Bab 18S F3 und Bab 18S R3 statt (Pauliks 2009).

4.4.2. *Borrelia* spp.

Für den Nachweis von *Borrelia* spp. wurde das *ospA* Gen amplifiziert (Michel et al. 2004, Lencakova et al. 2006). Ein ausführliches Protokoll der Reaktionsbedingungen und des sich anschliessenden Restriktionsverdaus ist in der Dissertationschrift von Katharina Pauliks beschrieben (Paulicks 2009).

4.4.3. *Coxiella burnetii*

Der Nachweis von *Coxiella burnetii* erfolgte durch Gernot Schmoock im Friedrich-Löffler Institut Jena mit der Amplifikation eines Abschnitts der Isocitrat Dehyrdrogenase und des Transposase Elements *IS1111* nach dem Protokoll von Klee und Kollegen (Klee et al. 2006).

4.4.4. *Francisella tularensis*

Der Nachweis von *Francisella tularensis* wurde von Wolf Splettstößer und Kollegen im Referenzzentrum für Tularämie, München durch Amplifikation eines Abschnittes der 16S rRNA im Rahmen einer Real- Time- PCR nach dem Protokoll von Kaysser durchgeführt.

4.5. Materialien

4.5.1. DNA Extraktion

Reagentien:

High Pure PCR Template Preperation Kit (Roche Diagnostics GmbH; Cat. No. 11 796 828 001), Ethanol absolut C_2H_5OH 99, 9% (Baker analyzed (UN1170)), PBS, Isopropanol C_3H_80 >99,7% (Roth (6752))

Geräte:

Pipetten (Eppendorf Research), Pinzetten, Vortexer (Heidolph REAX 2000), Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C), Thermoblock (Eppendorf Thermomixer compact)

4.5.2. Photometrische Konzentrationsmessung

Reagentien:

dsDNA aus *Ixodes ricinus*, *Aqua destillata*

Geräte:

Pipetten (nerbe plus), *Ultraspec 2000 UV visible Spectrophotometer* (Pharmacia Biotech Biochrom Science Parc)

4.5.3. PCR

Reagentien:

dNTP Mixture for PCR (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 2,5 mM), 10x PCR Buffer (KCl und $MgCl_2$ (15 mM)), TaqDNA Polymerase (TaKaRa Ex Taq^{TM})
TAKARA BIO INC. (RR001A), DEPC Wasser (Roth T143.3)

Primer:

1. *Anaplasma phagocyophilum*. Ap16 S1v und Ap16 S1r (Hildebrandt et al. 2002)
2. *Rickettsia* spp. RH 314 und RH 634 (Nilsson et al. 1999a)

Geräte:

Sterilbank (HERASafe HS 1212), Pipetten (Eppendorf Research), Zentrifuge (Roth Micro Centrifuge 040092), PCR Cycler (Biometra T3000 Thermocycler),

4.5.4. Gel Elektrophorese

Reagentien:

1x TAE- Puffer, Agarose (peqGOLD universal Agarose 35-1020), BIO- Rad AmpliSize^{TM} Molecular Ruler 50- 2.000 bp Ladder, Orange G 0,5 % (10 ml Aq. Dest, 10 ml Glycerol, 25 mM EDTA), *Sybr- green I* (FMC Bio Products Rockland)

Geräte:

Waage (KERN 440- 33), Mikrowelle (Samsung Classic), Bio-Rad Power Pac 200 und 300, Gelkammern (Bio Rad Wide Mini Sub^{TM} cell, DNA Sub Cell^{TM}), Pharmacia Biotech Image Master VDS, Fujifilm thermal imaging system FTI- 500 Liscap, Computer, Pipetten (Eppendorf Research).

4.5.5. Restriktionsverdau

Reagentien:

Fermentas *Sspl* 10 U/µl (ER0772), Fermentas 10x Buffer G with BSA 1 ml (BG5) DNA –Amplifikat, DEPC Wasser (Roth T143.3)

Geräte:

Brutschrank (memmert 35,4- 38,8°C), Pipetten (Eppendorf Research), Vortexer (Heidolph REAX 2000).

4.5.6. DNA Extraktion aus dem Gel

Reagentien:

Agarose Gel Extraction Kit (Jena Bioscience PP- 202L), DEPC Wasser (Roth T143.3), Megabase Solution (GE Healthcare UK)

Geräte:

Pipetten (Eppendorf Research), Vortexer (Heidolph REAX 2000), Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C), Vakuumzentrifuge (DNA Speed vac DNA110 Savant), Minizentrifuge (Roth Micro Centrifuge 040092), Heizblock (Temperiergerät T15 Adw Zimet), Thermomixer (Eppendorf Thermomixer compact)

4.5.7. Sequenzierung

Reagentien:

DYEnamic ET Terminator cycle Kit (GE Healthcare UK), Primer (Tab.4.2.1 und Tab. 4.3.1., Seite 35 und 38) Ethanol *absolute* C_2H_5OH 99,9%, Ethanol 70% (Roth)

Geräte:

Thermocykler (Master Cycler Eppendorf), Sequenzer (ABI Prism 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems), Sequenzierungssoftware (*Sequenz Analysis* 3.7), PC, Stoppuhr, Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415C), Pipetten (Finnpipetten Campus), Vakuumzentrifuge (DNA Speed vac DNA110 Savant), Heizblock (Temperiergerät T15 Adw Zimet)

5. ERGEBNISSE

5.1. DNA Extraktion aus der Zecke

Aufgrund der unterschiedlichen Morphe von Männchen, Weibchen und Nymphen erwarteten wir, dass sich die Konzentration der extrahierte DNA entsprechend der Größenverteilung Weibchen > Männchen > Nymphen verhält.

Diese Annahme wurde bestätigt wie man der aufgeführten Tab. 5.1. entnehmen kann. Durch die stichprobenartig durchgeführte Photometrie konnte ein systematischer Fehler des DNA-Extraktionsvorganges ausgeschlossen werden.

	niedrigste DNA- Konzentration (µg/µl)	höchste DNA- Konzentration (µg/µl)	durchschnittliche DNA- Konzentration (µg/µl)
Nymphe	1,2	60,4	10,7
Männchen	3,2	43,3	15,62
Weibchen	4,5	150	24,06

Tab. 5.1.

Durchschnittliche DNA Konzentration (µg/µl) der Zecken aufgeteilt nach Entwicklungsstadium

5.2. Ergebnisse der PCR und Sequenzierung von *Anaplasma* spp.

In der PCR zeigten 65 von 1000 untersuchten Zecken eine positive Amplifikation mit Primern Ap16 S1v und Ap16 S1r. Die aufgeführte Abb. 5.3.1 einer Gelelektrophorese veranschaulicht die Darstellung der typischen Bande bei 944 bp.

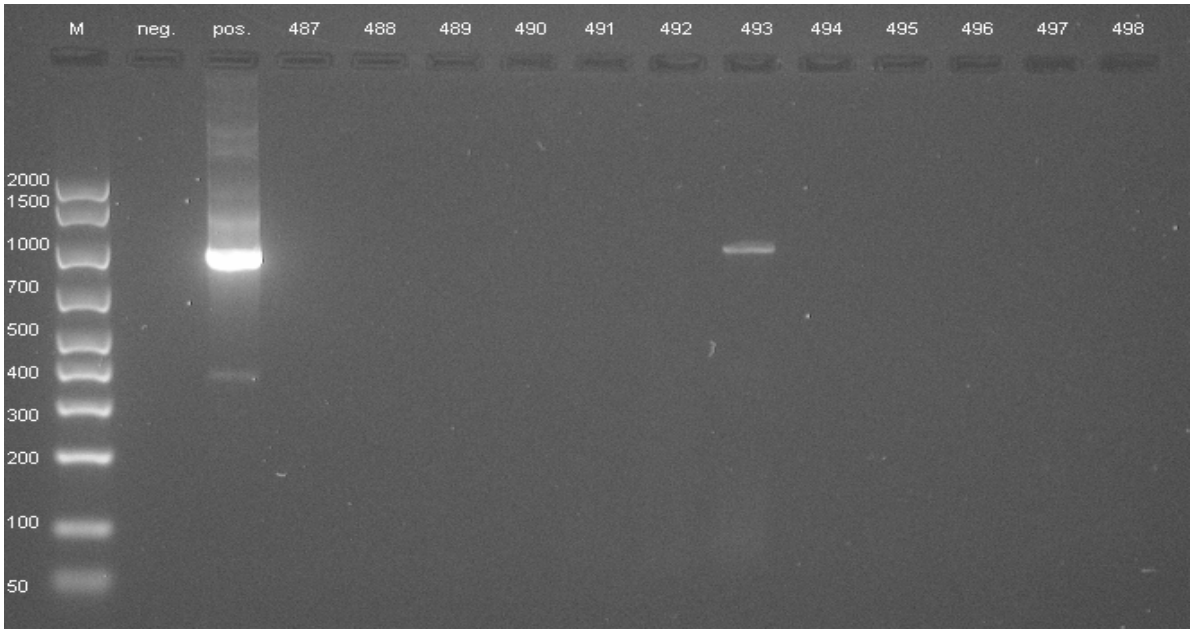


Abb. 5.2.

Diese Abbildung zeigt die Amplifikation der Zecken 487 bis 498 mit den Primern AP16 S1v und AP16 S1r. Das Amplifikat 493 ist positiv und zeigt sein spezifisches Amplifikat mit 944 bp in der Gelelektrophorese.

M = Marker, neg. = Negativkontrolle mit DEPC Wasser, pos. = Positivkontrolle (*Anaplasma phagocytophilum*)

Diese 65 in der PCR positiven Proben wurden weiter aufgearbeitet. Zeigten sie eine kräftige Bande in der Gelelektrophorese wurde diese ausgeschnitten und im Restriktionsverdau untersucht. Bei lediglich schwachen Banden wurde die vorhandene DNA des Erregers direkt sequenziert.

Nachfolgend zeigten sich 34 der 38 im Restriktionsverdau untersuchten Proben und 23 der 28 sequenzierten Proben positiv auf *Anaplasma* spp. Insgesamt stellten sich neun der 65 zunächst positiv bewerteten Proben als negativ dar.

Diese neun Proben zeigten sich bereits in der initial durchgeführten konventionellen PCR als nur fraglich positiv mit sehr schwachem oder nicht längenspezifischem Produkt.

In der Sequenzierung identifizierten wir alle positiven Proben als mit 99- 100% iger Übereinstimmung zu einem bereits zuvor aus Thüringen beschriebenen Isolat (Acc.Nr. AJ313513) als *Anaplasma phagocytophilum* (Hildebrandt et al. 2002).

5.3. Ergebnisse der PCR und Sequenzierung der *Rickettsia* spp.

In dieser PCR wurde ein Abschnitt des Citratsynthase Gens amplifiziert. Die Abb. 5.3.1. veranschaulicht ein typisches Elektrophoresebild mit dessen Hilfe die Unterteilung in positiv bzw. negativ vorgenommen wurde.

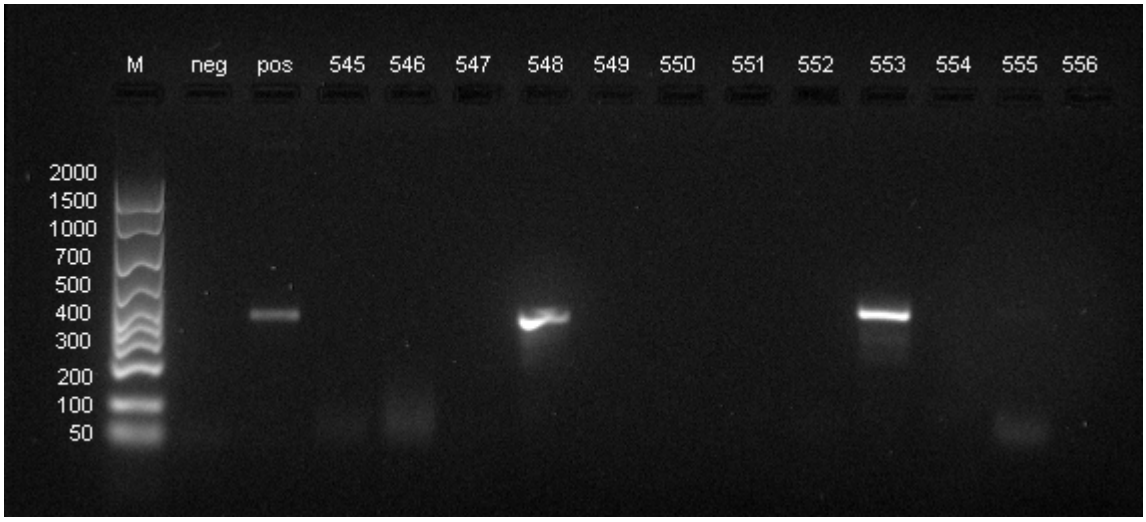


Abb. 5.3.1.

Diese Abbildung zeigt die Amplifikation der extrahierten DNA der Zecken 655 bis 666 mit den Primern RH 314 und RH 654. Die Amplifikate 664 und 666 sind positiv und zeigen ihr spezifisches Amplifikat mit 340 bp in der Gelelektrophorese. Die exakte Höhe der Markerbanden wird durch die erhöhten seitlichen Begrenzungen dargestellt. Eine Möglichkeit für die ungenaue Darstellung der Markerbanden ist eine Überladung. Beachtet man dieses Phänomen befinden sich positiv Kontrolle und positive Amplifikate in der korrekten Höhe von 340 bp.

M = Marker, neg. = Negativkontrolle mit DEPC- Wasser, pos. = Positivkontrolle (*Rickettsia monacensis*)

In der Gelelektrophorese zeigten sich 66 von 1000 untersuchten Amplifikaten positiv mit Produkten von 340 bp. Weitere 153 Proben stellten sich fraglich positiv, mit entweder schwachem Produkt oder nicht größenspezifisch dar. Die positiven und fraglich positiven Proben wurden in der anschließenden Restriktionsanalyse bzw. Sequenzierung weiter analysiert. Bei großer Produktmenge fand ein Restriktionsverdau statt, bei geringer Ausbeute eine Sequenzierung.

Im Restriktionsverdau mittels *SspI* stellten sich 100 von 145 analysierten Proben positiv mit zwei Produkten von 123 bp bzw. 217 bp dar. Ein typisches Gelelektrophoresebild nach erfolgten Restriktionsverdau stellt Abb. 5.3.2. dar.

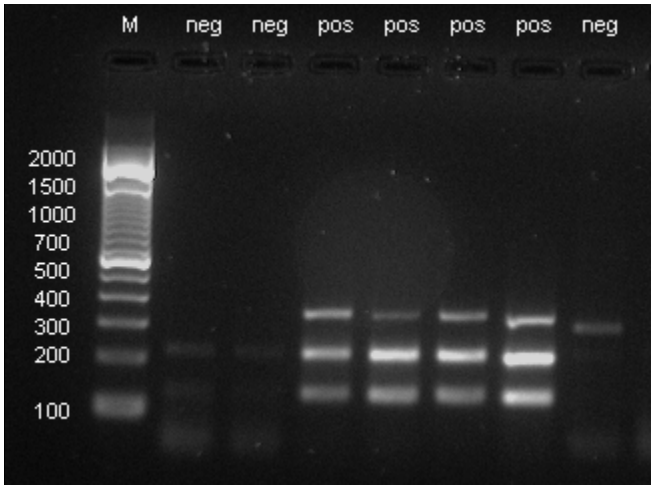


Abb. 5.3.2.

Agarosegel nach Restriktionsverdau. Die drei Banden aufweisenden Proben stellen geschnittene Amplifikate von *Rickettsia* spp. dar. Die Produkte sind 123 bp und 217 bp groß und entsprechen der erwarteten Fragmentlänge von *Rickettsia* spp.

Bei den 98 sequenzierten Proben ergaben 64 eine *Rickettsia* spp. spezifische Sequenz, die mit Hilfe der NCBI Datenbank den in Abb. 5.3.3. aufgeführten Spezies zugeordnet werden konnte.

Der Großteil der Zecken war mit *R. helvetica* (45%) infiziert, die analysierten Sequenzen stimmten zu 99-100% mit der Zugangsnummer DQ131912 (Igolkina, Y.P. et al., unpublished) der GenBank/EMBLdatabase überein.

Eine 98,4-100 %ige Übereinstimmung mit der Zugangsnummer DQ100163 (Burkhardt, N.Y. et al., unpublished) wiesen 19% der nachgewiesenen *Rickettsia* spp. auf und konnten somit als *R. monacensis* identifiziert werden. Aufgrund der nur geringen genetischen Variabilität des Citrat synthase Gens (*gltA*) innerhalb der *spotted fever group* Rickettsien konnten 36% nicht weiter spezifiziert werden und wurden als *Rickettsia* spp. zusammengefasst. Diese Ergebnisse sind in Abb. 5.3.3. graphisch dargestellt.

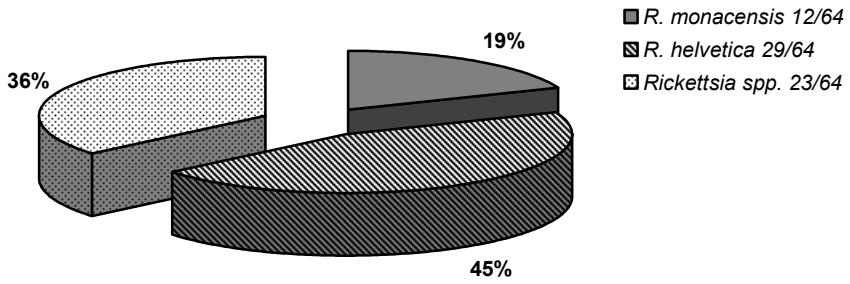


Abb. 5.3.3.

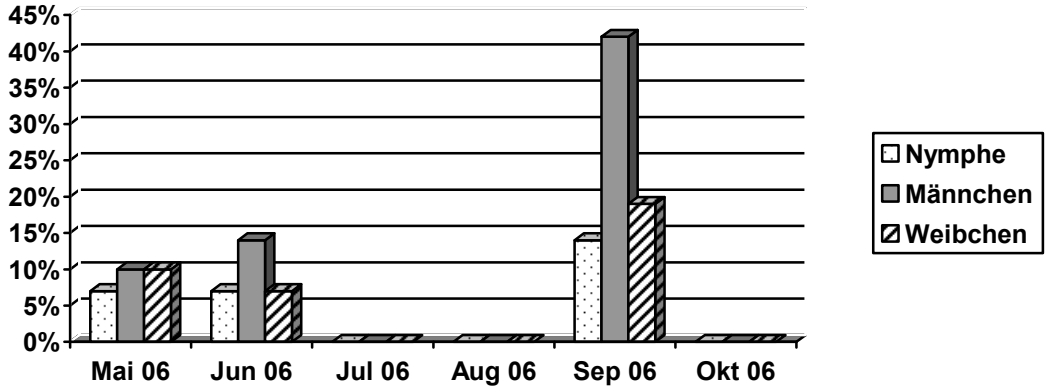
Die Graphik verdeutlicht ein Überwiegen von *Rickettsia helvetica* (45%) bei den 64 positiven Amplifikate vor *R. monacensis* (19%). In der Sequenzierung konnten 23 von 64 Erregern nicht weiter spezifiziert werden und wurden als *Rickettsia* spp. zusammengefasst

5.4. Prävalenzen

5.4.1. *Anaplasma* spp.: Entwicklungsstadium und saisonale Abhängigkeit

Insgesamt waren 5,4% (54/1000) der Zecken mit *Anaplasma phagocytophilum* infiziert. Im Jahr 2006 waren es 6,7% (34/506) und im Jahr 2007 4,0% (20/494), es besteht kein signifikanter Unterschied der Infektionsraten beider Jahre. Die Prävalenz zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in den verschiedenen Entwicklungsstadien. Es waren 6% (34/ 540) der adulten Zecken und 4,7% (20/ 430) der Nymphen infiziert.

Die meisten mit *Anaplasma* spp. befallen Zecken wurden in den Sommermonaten August und September gefangen (siehe Abb. 5.4.2.a und Abb. 5.4.2.b). Vor allem die hohe Infektionsrate im September ist auffällig, da in den umgebenden Monaten keine Infektion nachgewiesen werden konnte.

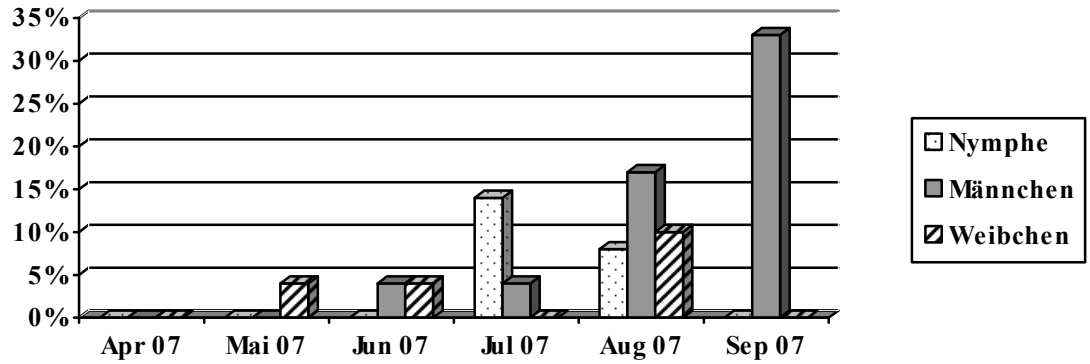


	Mai 06	Jun 06	Jul 06	Aug 06	Sep 06	Okt 06
Nymphe	2/28 (7,1%)	2/30 (6,7%)	0/31 (0%)	0/38 (0%)	7/49 (14,3%)	0/30 (0%)
Männchen	3/29 (10,3%)	4/28 (14.3%)	0/27 (0%)	0/28 (0%)	5/12 (41,7%)	0/17 (0%)
Weibchen	3/29 (10,3%)	2/29 (6,9%)	0/29 (0%)	0/28 (0%)	5/26 (19,2%)	0/18 (0%)

Abb. 5.4.1.

Graphik und Tabelle zeigen die Anzahl der mit *Anaplasma* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2006 in Prozent aufgeteilt nach Entwicklungsstadium und Sammelmonat

Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September, Okt = Oktober



	Apr 07	Mai 07	Jun 07	Jul 07	Aug 07	Sep 07
Nymphe	0/28 (0%)	0/28 (0%)	0/28 (0%)	4/28 (14,3%)	5/62 (8,1%)	0/50 (0%)
Männchen	0/28 (0%)	0/28 (0%)	1/28 (3,6%)	1/23 (4,3%)	4/23 (17,4%)	2/6 (33,3%)
Weibchen	0/24 (0%)	1/28 (3,6%)	1/28 (3,6%)	0/28 (0%)	2/20 (10,0%)	0/6 (0%)

Abb. 5.4.2.

Graphik und Tabelle zeigen die Anzahl der mit *Anaplasma* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2007 in Prozent aufgeteilt nach Entwicklungsstadium und Sammelmonat.

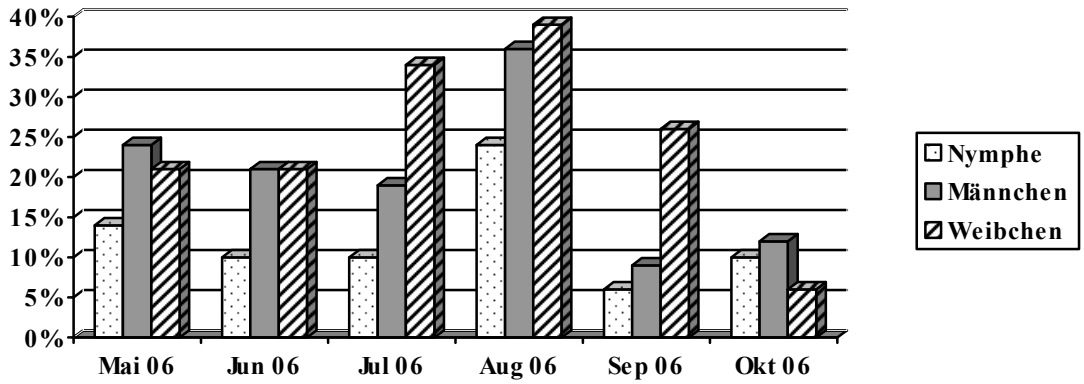
Die meisten mit *Anaplasma* spp. infizierten Zecken wurden im August 2007 gefangen

Apr = April, Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September

5.4.2. *Rickettsia* spp.: Entwicklungsstadium und saisonale Abhängigkeit

Die untersuchten Zecken waren zu 14,7% mit *Rickettsia* spp. infiziert, wobei die Adulten 19,8% (107/ 540) signifikant häufiger eine Infektion mit *Rickettsia* spp. aufwiesen als die Nymphen 9,3% (40/ 430) (2006: $p = 0{,}001$, 2007: $p = 0{,}022$).

Die höchste Prävalenz zeigten die in den Monaten Juli und August gefangenen Tiere, so dass ein unimodales Saisonalitätsmuster festgestellt werden konnte. Die Abb. 5.4.1a und b stellen die Ergebnisse dar. Im Jahr 2007 waren signifikant weniger Zecken mit *Rickettsia* spp. infiziert als im Jahr 2006 ($p < 0{,}001$).

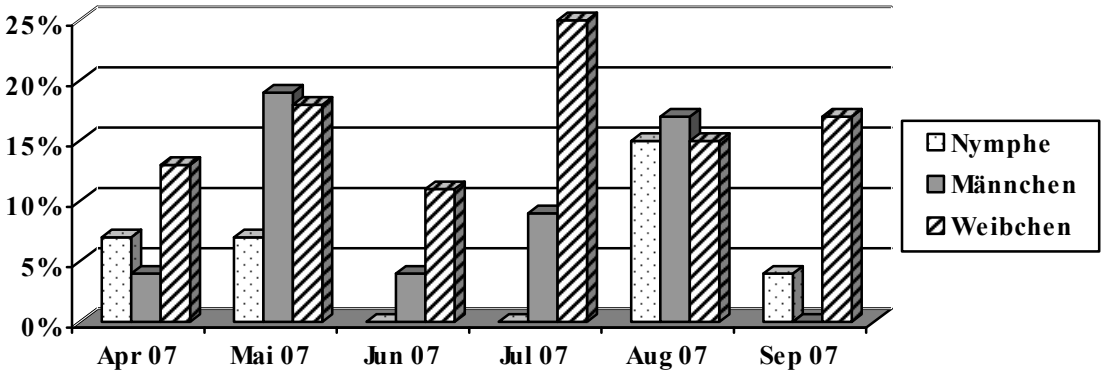


	Mai 06	Jun 06	Jul 06	Aug 06	Sep 06	Okt 06
Nymphe	4/28 (14,3%)	3/30 (10%)	3/31(9,7%)	9/38 (23,7%)	3/49 (6,1%)	3/30 (10%)
Männchen	7/29 (24,1%)	6/28 (21,4%)	5/27 (18,5%)	10/28(35,7%)	1/12 (8,3%)	2/17 (11,8%)
Weibchen	6/29 (20,7%)	6/29 (20,7%)	10/29(34,5%)	11/28(39,3%)	7/27(25,9%)	1/17 (5,9%)

Abb. 5.4.3.

Graphik und Tabelle zeigen die Anzahl der mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2006 in Prozent aufgeteilt nach Entwicklungsstadium und Sammelmonat

Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September, Okt = Oktober



	Apr 07	Mai 07	Jun 07	Jul 07	Aug 07	Sep 07
Nymphe	2/28 (7,1%)	2/28 (7,1%)	0/28(0%)	0/28 (0%)	9/62 (14,5%)	2/50 (4,0%)
Männchen	1/28 (3,6%)	5/28 (17,9%)	1/28 (3,6%)	2/23 (8,7%)	4/23 (17,4%)	0/6 (0%)
Weibchen	3/24 (12,5%)	5/28 (17,9%)	3/28 (10,7%)	7/28 (25,0%)	3/20 (15,0%)	1/6 (16,7%

Abb. 5.4.4.

Graphik und Tabelle zeigen die Anzahl der mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2007 in Prozent aufgeteilt nach Entwicklungsstadium und Sammelmonat

Apr = April, Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September

5.4.3. Statistik

- Infektionsrate in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium

Insgesamt waren signifikant mehr Adulte als Nymphen mit *Rickettsia* spp. infiziert. 2006 war dieses Ergebnis mit einem $p = 0{,}001$ hochsignifikant, 2007 mit $p = 0{,}022$ signifikant.

Bei den mit *Anaplasma phagocytophilum* infizierten Zecken konnte eine solche Beobachtung nicht getroffen werden ($p = 0{,}07$).

- Saisonale Abhängigkeit der Infektionsraten

Die Vermutung der Zunahme der Infektionsrate im Verlauf des Jahres konnte statistisch nicht bestätigt werden. Es fällt jedoch ein Infektionspeak in den Sommermonaten auf, welcher sich bei *Rickettsia* spp. im Juli/ August und bei *Anaplasma* spp. im August/ September befindet (Abb. 5.4.1., 5.4.2., 5.4.3., 5.4.4.). Auffällig ist die doppelt so hohe Infektionsrate mit *Rickettsia* spp. 2006 im Vergleich zu 2007, die mit einem $p < 0{,}001$ hochsignifikant ist.

- Konfidenzintervalle

Je größer die untersuchte Population desto kleiner wird das Konfidenzintervall. Diese spiegelt die tatsächliche Infektionsrate wieder indem es aussagt, dass mit einer 95% Wahrscheinlichkeit der gesuchte Wert, in unserem Fall die Prävalenz, zwischen der oberen und unteren Grenze liegt.

Die Konfidenzintervalle zur Prävalenz von *Rickettsia* spp. und *Anaplasma phagocytophilum* sind ebenso wie die zur statistischen Auswertung verwendeten SPSS- Tabellen im Anhang aufgeführt (ab Seite 85).

5.4.4. Koinfektionen

Die untersuchten Zecken waren zu einem Prozent (10/1000) sowohl mit *Rickettsia* spp. als auch *Anaplasma phagocytophilum* infiziert. Die Abb. 5.4.5. veranschaulicht die Infektions- und Koinfektionsrate der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zecken mit *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp.

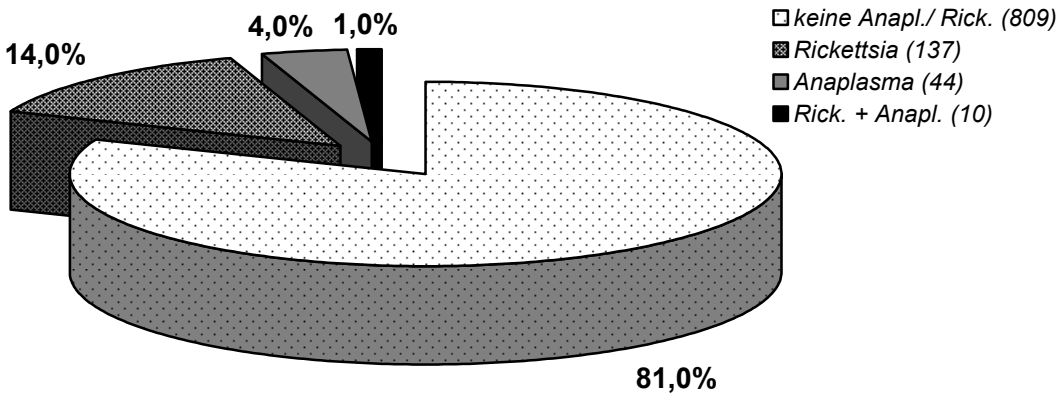


Abb. 5.4.5.

Die Graphik zeigt die Prävalenz von *Rickettsia* spp.*, Anaplasma phagocytophilum* und den Koinfektionen. Der größte Teil der untersuchten Zecken war mit keinem der gesuchten Erreger befallen. Anapl. = *Anaplasma* spp., Rick. = *Rickettsia* spp.

Ebenfalls wurden die in dieser Arbeit analysierten Zecken auf Infektionen mit *Borrelia* spp., *Babesia* spp. (Institut für Medizinische Mikrobiologie FSU Jena, Katharina Pauliks), *Francisella tularensis* (Referenzzentrum für Tularämie in München, Wolf Splettstößer) und *Coxiella burnetii* (Frieddrich Löffler Institut in Jena, Gernot Schmoock) untersucht (Hildebrandt et al. 2010a, Hildebrandt et al. 2010b, Hildebrandt 2011a). Die Koinfektionsraten, welche sich aus allen durchgeführten Untersuchungen ergeben, werden in den Abb. 5.4.7. und Abb. 5.4.8. gesondert dargestellt. Diese Graphiken verdeutlichen desweiteren, dass mehr adulte *Ixodes ricinus* Zecken (51,4%, 293/570) im Vergleich zu den Nymphen (33,3%, 143/430) mit humanpathogenen Erregern infiziert sind.

Insgesamt waren 10% (100/1000) aller untersuchten *Ixodes ricinus* Zecken koinfiziert. Am häufigsten traten Doppelinfektionen auf, jedoch konnte auch eine Vierfachinfektion mit *B. garinii*, *B. burgdorferi*, *R. helvetica* sowie *Babesia microti* nachgewiesen werden. Zur Veranschaulichung der Verteilung der Koinfektionen dient Abb. 5.4.6.

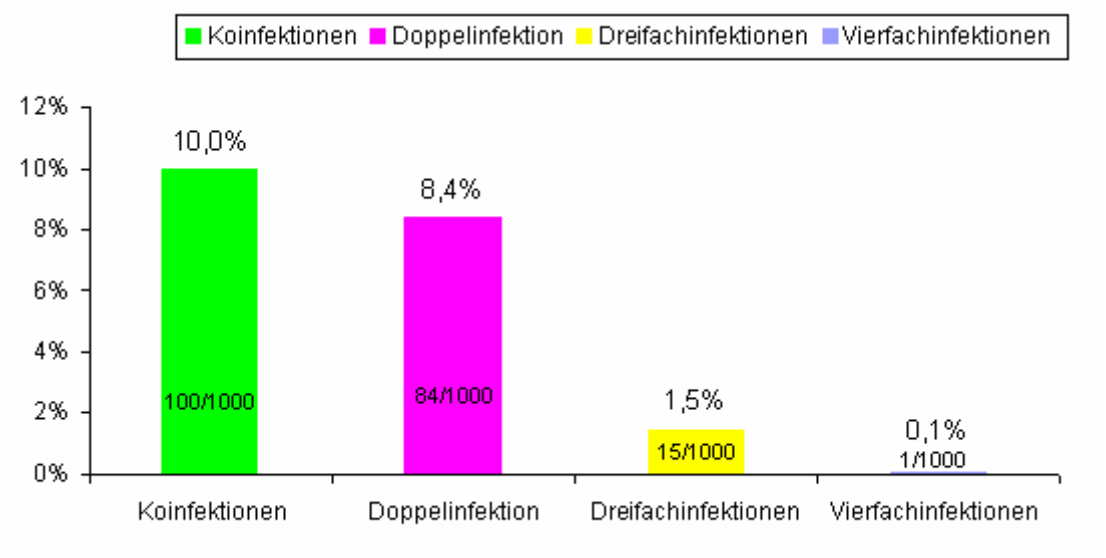


Abb. 5.4.6.

Zehn Prozent der 1000 *Ixodes ricinus* Zecken aus dem Zeitzgrund waren unter Berücksichtigung der erhobenen Daten von (Hildebrandt 2011a, Hildebrandt et al. 2010b, Hildebrandt et al. 2010a) koinfiziert. Doppelinfektion: 84/1000, Dreifachinfektion: 15/1000, Vierfachinfektion: 1/1000.

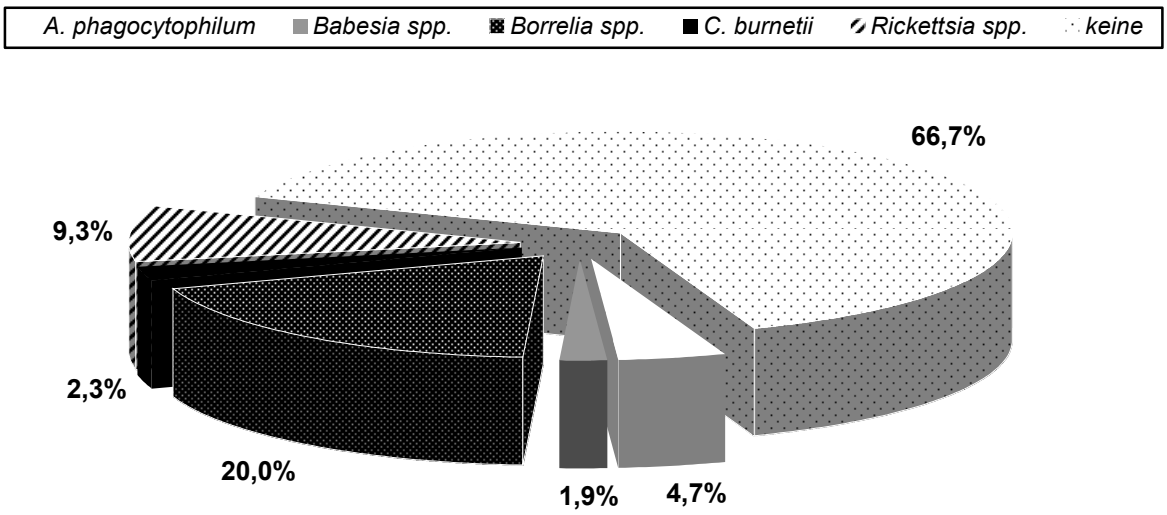


Abb. 5.4.7.

Die Graphik zeigt die Prävalenz von *A. phagocytophilum* (27/430), *Babesia* spp. (8/430), *Borrelia* spp (86/430)., *C. burnetii* (10/430), *F. tularensis* (0/430) und *Rickettsia* spp. (40/430) der 2006 und 2007 untersuchen 430 Nymphen aus dem Zeitzgrund mit Berücksichtigung der erhobenen Daten von (Hildebrandt et al. 2010a, Hildebrandt et al. 2010b, Hildebrandt 2011a)

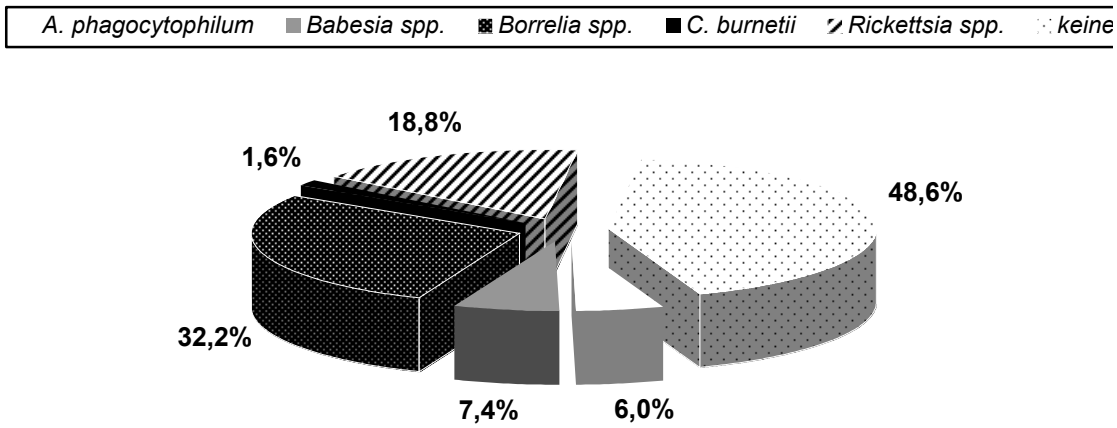


Abb. 5.4.8.

Die Graphik zeigt die Prävalenz von *A. phagocytophilum* (34/570)*, Babesia* spp. (42/570), *Borrelia* spp. (183/570), *C. burnetii* (9/570)*, F. tularensis* (0/570) und *Rickettsia* spp. (107/570) der 2006 und 2007 untersuchen 570 adulten *Ixodes ricinus* Zecken aus dem Zeitzgrund mit Berücksichtigung der erhobenen Daten von (Hildebrandt et al. 2010a, Hildebrandt et al. 2010b, Hildebrandt 2011a)

Von den 54/1000 der mit *Anaplasma* spp. infizierten Zecken waren 23/54 mit anderen Erregern koinfiziert. Die Verteilung der Koinfektionen stellt Abb. 5.4.9. dar. Hierzu wurden die absoluten Zahlen der verschiedenen Koinfektionen mit der *Anaplasma* spp. Infektionsrate ins Verhältnis gesetzt. Es ergab sich eine Dominanz der Koinfektion mit *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp. in adulten *Ixodes ricinus* Zecken.

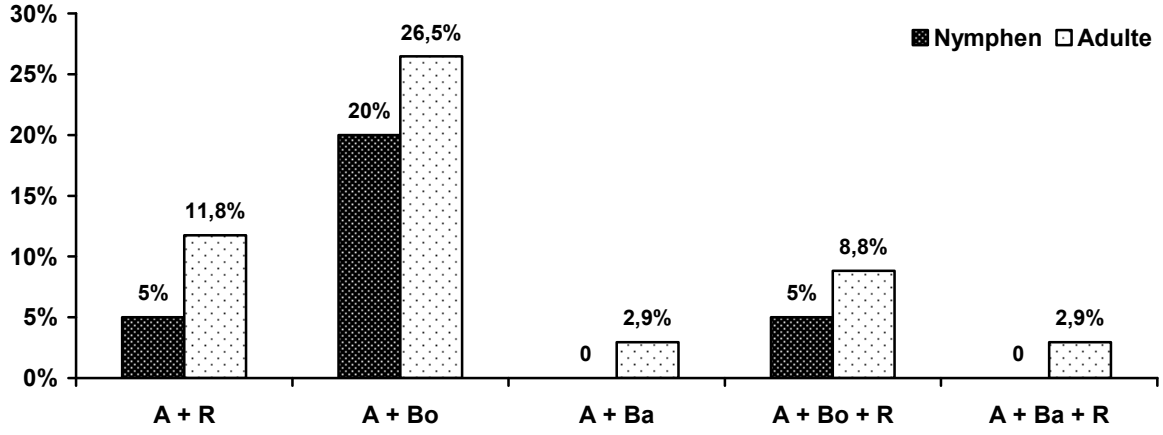


Abb. 5.4.9.

Die Graphik stellt die aufgetretenen Koinfektionen graphisch dar. Es waren 42,6% (23/54) der mit *Anaplasma* spp. infizierten Zecken koinfiziert. Diese setzen sich aus 6 Nymphen (6/20) und 17 Adulten (17/34) zusammen. R = *Rickettsia* spp., A = *Anaplasma* spp., Bo = *Borrelia* spp

Von den 147/1000 der mit *Rickettsia* spp. infizierten Zecken waren 58/147 mit anderen Erregern koinfiziert. Die Verteilung der Koinfektionen stellt Abb. 5.4.10. dar. Hierzu wurden die absoluten Zahlen der verschiedenen Koinfektionen mit der *Rickettsia* spp. Infektionsrate ins Verhältnis gesetzt.

Die Analyse der extrahierten DNA auf weitere Erreger erbrachte erstmalig den Nachweis einer Koinfektion mit *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* Zecken (Hildebrandt 2010b).

Es imponiert die häufige Koinfektion von *Rickettsia* spp. mit *Borrelia* spp. in adulten *Ixodes ricinus* Zecken.

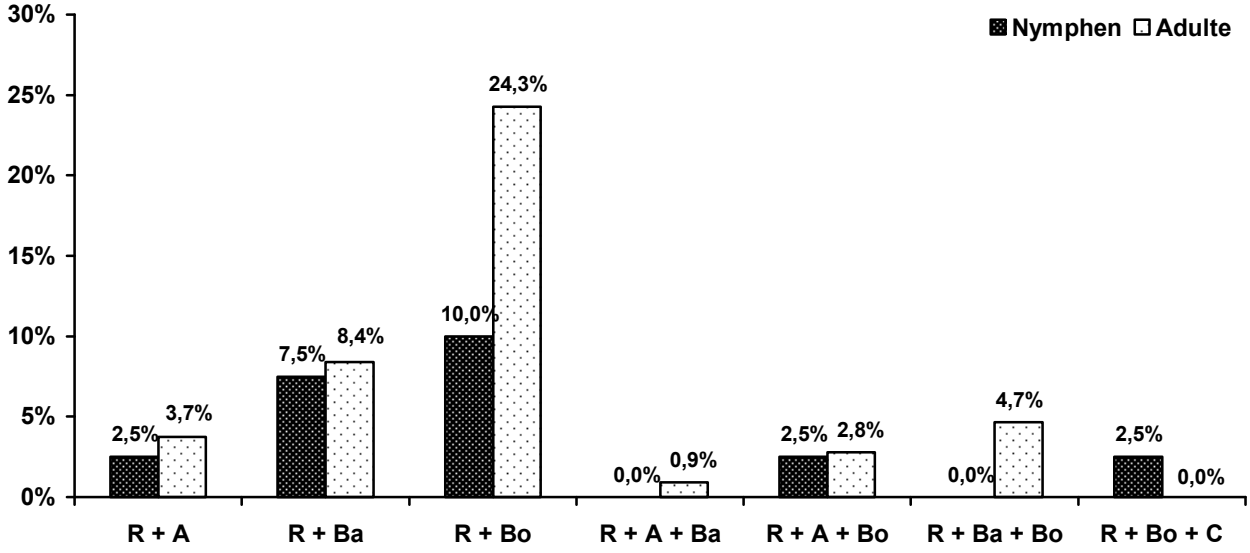


Abb. 5.4.10.

Die Graphik stellt die aufgetretenen Koinfektionen graphisch dar. Es waren 39,4% (58/147) der mit *Rickettsia* spp. infizierten Zecken koinfiziert. Diese setzen sich aus 9 (9/40) Nymphen und 49 (49/107) zusammen. R = *Rickettsia* spp., A = *Anaplasma* spp., Bo = *Borrelia* spp., C = *Coxiella burnetii*

6. DISKUSSION

6.1. *Anaplasma phagocytophilum*

6.1.1. Prävalenz

Die Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* unterliegt weltweit großen regionalen Schwankungen. Die Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit ergibt eine Infektionsrate von 4,7% der untersuchten *Ixodes ricinus* Zecken im Zeitzgrund (Thüringen). Dies stimmt gut mit der durchschnittlichen Infektionsrate innerhalb Deutschlands überein (siehe Tab 6.1.1.).

LAND	PRÄVALENZ	TARGET	LITERATUR
Deutschland	4,1% 2,9% 2, 3% 1,4%	16S rDNA + *groESL* *msp2* 16S rDNA 16S rDNA	(von Loewenich et al. 2003) (Silaghi et al. 2008) (Hildebrandt et al. 2002) (Hildebrandt et al. 2011b)
Dänemark	1,3- 15% (Pool)	*msp2*	(Severinsson et al. 2010)
England	4% 7%	16S rDNA 16S rDNA	(Ogden et al. 1998) (Guy et al. 1998)
Frankreich	0,8% 0,3%	16S rDNA	(Ferquel et al. 2006) (Cotte et al. 2010)
Italien	24.4%	16S rDNA	(Cinco et al. 1997)
Luxemburg	1,9%	*groESL*	(Reye et al. 2010)
Marokko	12%	16S rDNA	(Sarih et al. 2005)
Niederlande	6,8%	16S rDNA	(Wielinga et al. 2006)
Nordpolen	19,1% 4,1% 23,7% 8,7%	16S rDNA 16S rDNA 16s rDNA 16S rDNA	(Stanczak et al. 2004) (Skotarczak et al. 2006) (Grzeszczuk und Stanczak 2006b) (Grzeszczuk et al. 2004)
Norwegen	9,7%	16S rDNA	(Jenkins et al. 2001)
Ostpolen	5% 6%	16S rDNA 16S rDNA	(Wojcik-Fatla et al. 2009) (Cisak et al. 2005)
Österreich	8,7%	*groESL*	(Polin et al. 2004)

Polen	14,1%	16S rDNA	(Grzeszczuk und Stanczak 2006a)
Portugal	4%	*msp2*	(Santos et al. 2004)
Russland	8,8%	*p44/ msp2*	(Masuzawa et al. 2008)
Schweden	1,3- 15%	16S rDNA	(Severinsson et al. 2010)
Schweiz	1,4% 1,3%	16S rDNA 16S rDNA	(Liz et al. 2001) (Pusterla et al. 1999)
Slowakei	8,3%	16S rDNA	(Derdakova et al. 2003)
Slowenien	3,2%	16S rDNA + *groESL*	(Petrovec et al. 1999)
Tunesien	15%	16S rDNA	(Sarih et al. 2005)
Zentralpolen	13,1% 10,2% 2,8%	16S rDNA 16S rDNA *ankA* Gen	(Tomasiewicz et al. 2004) (Chmielewska-Badora et al. 2007)

Tab. 6.1.1
Infektionsrate (in Prozent) mit *Anaplasma* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken in Europa

Die Tabelle 6.1.1. stellt einen Überblick über die Infektionsraten und die untersuchten Nukleinsäuresequenzen in Europa dar. Sie beschränkt sich auf Regionen in denen *Ixodes ricinus* endemisch ist, um eine Vergleichbarkeit mit den in dieser Arbeit gewonnen Daten zu gewährleisten. Es wurden freilebende *Ixodes ricinus* Zecken untersucht, jedoch griff Sarih auch auf *Rhipicephalus* und *Hyalomma* Zecken zurück, Masuzawa auf *Ixodes ricinus* und *Ixodes persulcatus.*
Auffällig ist die große der Varianz der Infektionsraten, welche von 0,8% im Elsass (Ferquel et al. 2006) bis 23,7% in Nordpolen (Grzeszczuk und Stanczak 2006b) reichen. Die Prävalenz von *Anaplasma* spp. hängt vor allem von den im Habitat lebenden potentiellen Wirten von *Ixodes ricinus*, sowie den regionalen klimatischen und geologischen Beschaffenheiten ab (Woldehiwet 2010). Bei Schafen, Pferden und Rindern sind im Rahmen der Bakteriämie bis zu 90% der Granulozyten mit *Anaplasma* spp. infiziert. Die Bakteriämie kann über zwei Wochen bestehen, so dass sich diese Wirtstiere sehr gut als Reservoir für *Anaplasma* spp. eignen (Woldehiwet und Scott 1982, Tuomi 1967). Der Mensch wird als ungünstiger Wirt angesehen, da nur bei einem Viertel der Infizierten eine Bakteriämie auftritt und in dieser meist nur 6% der Granulozyten mit *Anaplasma* spp. infiziert sind (Woldehiwet 2010).

Desweiteren scheinen klimatische Faktoren, wie zum Beispiel feucht- warmes Wetter, die Überlebenswahrscheinlichkeit der *Anaplasma* spp. infizierten Zecken zu verbessern. Sonenshine beschrieb einen zweigipfligen Verlauf der Aktivitätskurve von *Ixodes ricinus* Zecken in den gemäßigten Breiten (Sonenshine 1991). Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit weder bei den absoluten Zahlen an gefangenen Zecken, noch in der Prävalenz von *Anaplasma* spp. im Frühling und Herbst nachempfunden werden. Auffällig war ein Maximum der Infektionsraten im September 2006 und August/ September 2007. Ein solcher Infektionspeak konnte in einer niederländischen Studie ebenfalls gezeigt werden (Wielinga et al. 2006).

Grzeszcuk und Stanczak publizierten eine jährlich stark schwankende Infektionsrate von 6 bis 73% in Polen (Grzeszczuk und Stanczak 2006a). Es ist zu vermuten, dass es innerhalb eines Jahres unterschiedliche Risiken für die Übertragung von *Anaplasma* spp. auf den Menschen gibt. Im Zeitzgrund trifft dies auf die Monate August und September zu.

Die hohe Prävalenz der risikoexponierten Bevölkerung steht im Gegensatz zu der niedrigen Erkrankungsrate. Für Europa liegen keine gesicherten Daten bezüglich zur Inzidenz der HGA vor, in der Literatur sind jedoch 65 nachgewiesene Fälle beschrieben (Strle 2004). Dumler und Kollegen gaben eine Inzidenz von 52/100.000 in Nordamerika an (Bakken und Dumler 2006). Die niedrige Erkankungsrate lässt sich zum einen mit dem Vorhandensein apathogener *Anaplasma* spp. Stämme erklären, welche zu Seropositivität führt ohne klinische Symptome zu verursachen (Fingerle et al. 1997). Zum anderen wird eine HGA oft nicht als Differentialdiagnose bei fieberhaften Erkrankungen berücksichtigt und somit dieses Erkrankungsbild häufig nicht als solches diagnostiziert.

In den durchgeführten Studien, welche in Tab. 6.1.2. zitiert werden, galten Waldarbeiter sowie Personen mit anamnestisch und serologisch durchlebter Borreliose als Hochrisikogruppen für Zeckenbisse mit nachfolgender Infektion mit *Anaplasma* spp..

LAND	PRÄVALENZ	KRITERIEN	LITERATUR
Bulgarien	11% 2,9%	A D	(Christova und Dumler 1999) (Christova und Dumler 1999)
Dänemark	3,8%	B	(Lebech et al. 1998)

	30% 95,6%	B F	(Skarphedinsson et al. 2001) (Skarphedinsson et al. 2005)
Deutschland	14% 11,4% 1,9%	C B D	(Fingerle et al. 1997) (Fingerle et al. 1997) (Fingerle et al. 1997)
Polen	20,6% 0% 17,7% 5,4% 9,1% 2%	C D C D B D	(Tomasiewicz et al. 2004) (Tomasiewicz et al. 2004) (Cisak et al. 2005) (Cisak et al. 2005) (Grzeszczuk et al. 2004) (Grzeszczuk et al. 2004)
Schweden	8%	E	(Dumler et al. 1997)

Tab. 6.1.2.

Serologische Daten einer Infektion mit *Anaplasma* spp. aus europäischen Ländern.

A: Personen mit anamnestisch erlittenem Zeckenbiss; B: Personen mit durchlebter Borreliose C: Waldarbeiter; D: gesunde Blutspender; E: Landbevölkerung, F: Serum von Rotwild

Auffällig bleibt der serologisch hohe prozentuelle Anteil von *Anaplasma* spp. Infektionen bei gleichzeitiger Seropositivität für *Borrelia* spp., welcher in Tab. 6.1.2. dargestellt ist. Dieser liegt zwischen 3,8 bis 30%, wohingegen die Koinfektionsrate von *Ixodes ricinus* bei lediglich 0,7 bis 8,3% (Referenzen siehe Tab. 6.3., Seite 67) liegt. Dies könnte durch die ausgeprägte Exposition der untersuchten Population gegenüber Zecken erklärt werden. Die betroffenen Personen unterlagen mehrfach einem Zeckenbiss und akquirierten somit beide Infektionen durch unterschiedliche Zecken.

Tabelle 6.1.3. verdeutlicht, dass die weiblichen *Ixodes ricinus* Zecken die Schlüsselrolle in der Übertragung von *Anaplasma* spp. in Europa tragen. Nahezu einheitlich wird die erhöhte Infektionsrate der adulten Zecken im Vergleich zu den Nymphen berichtet. Nymphen saugten einmalig Blut als Larve, wohingegen Adulte bereits zweimal saugten. Desweiteren nehmen die Weibchen bis zum 200fachen ihres Körpergewichtes an Blut auf, so dass ihr Infektionsrisiko während des Saugaktes höher als bei Männchen und Nymphen ist (Halos et al. 2010). Außerdem tritt bei kleinen Säugetieren keine ausgeprägte Bakteriämie mit *Anaplasma* spp. auf (Fingerle et al. 1999), so dass die Übertragung während des Saugaktes nur ineffizient stattfinden kann. Vor allem Nymphen saugen an kleinen

Säugetieren, wohingegen adulte *Ixodes ricinus* Zecken an mittelgroßen und großen Säugetieren saugen, welche eine ausgeprägtere Bakteriämie mit *Anaplasma* spp. aufwiesen (Fingerle et al. 1999). Es besteht ebenfalls die Möglichkeit eines *Confounding Bias*, da die Nymphen weniger DNA als Adulte und Männchen weniger als die Weibchen enthalten (Sonenshine 1991). Dies könnte dazu führen, dass die Erregerlast von Nymphen und Männchen unterhalb der PCR Nachweisgrenze liegt, welche auch von der Sensitivität der jeweiligen verwendeten PCR abhängig ist.

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der Prävalenz von *Anaplasma* spp. zwischen Adulten 6% und Nymphen 4,7% festgestellt werden (2006: p = 0,2, 2007: p = 0,6). Ob diese Tatsache epidemiologisch (Habitat) oder methodisch (DNA-Extraktion) bedingt ist, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

LITERATUR	WEIBCHEN	MÄNNCHEN	NYMPHEN
(Silaghi et al. 2008)	5,7%	4%	1,1%
(Tomasiewicz et al. 2004)	45,7%	4,5%	0,9%
(Skarphedinsson et al. 2007)	Adulte: 40,5%	Adulte: 40,5%	14,5%
(Grzeszczuk et al. 2004)	23,3%	4,2%	2,1%
(Cisak et al. 2005)	11,1%	14,3%	1,5%
(Grzeszczuk und Stanczak 2006a)	36,7%	8,2%	0,8%
(Grzeszczuk und Stanczak 2006b)	36.8%	16,6%	10,5%
(Stanczak et al. 2004)	47,6%	8,6%	2%
(Severinsson et al. 2010)	0%	0%	11,5%
(Wojcik-Fatla et al. 2009)	12,7%	5,3%	1%
(Reye et al. 2010)	3,4%	1,6%	1,5%
(Halos et al. 2010) Wald Weide	10,7% 2,2%	4,3% 9,4%	1,7% 2,6%

Tab 6.1.3. Prävalenz von mit *Anaplasma phagocytophilum* infizierten *Ixodes ricinus* Zecken (aufgeschlüsselt nach Entwicklungsstadium)

6.2. *Rickettsia* spp.

6.2.1. Prävalenz

Sowohl die Prävalenz von *Rickettsia* spp. als auch die Prävalenz von *Anaplasma* spp. unterliegt weltweit großen Schwankungen. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten wurden mit epidemiologischen Daten aus Europa verglichen, welche in Tab. 6.2.1. zusammengestellt sind. In dieser Arbeit fand sich eine Prävalenz von 14,7%, wobei sich die Infektionsrate der Adulten mit 19,8% im Vergleich zu den Nymphen mit 9,8% signifikant (p = 0,024) unterschied. Diese Prävalenz liegt leicht über dem deutschlandweiten Durchschnitt.

LAND	SPEZIES	PRÄVALENZ	LITERATUR
Dänemark	*R. helvetica*	4%	(Nielsen et al. 2004)
	R. helvetica	1,5- 17,3% (Pool)	(Severinsson et al. 2010)
Deutschland	*R. helvetica*	4.1%	(Hildebrandt et al. 2011b)
	R. helvetica	5,3%	(Silaghi et al. 2008)
	R. helvetica	12%	(Wolfel et al. 2006)
	R. helvetica	8,9%	(Hartelt et al. 2004)
Frankreich	*R. helvetica*	2,5%	(Parola et al. 1998)
	R. helvetica	1,4%	(Cotte et al. 2010)
Italien	*gltA* Gen	8,25%	(Beninati et al. 2002)
Luxemburg	17 kDA	5,1%	(Reye et al. 2010)
Niederlande			
Düne	16S rDNA	66%	(Sprong et al. 2009)
Eichenwald	16S rDNA	6%	(Sprong et al. 2009)
Polen	*gltA* Gen	32,7%	(Chmielewski et al. 2009)
		12,7%	(Stanczak et al. 2009)
Portugal	*gltA Gen*	6,9%	(de Sousa et al. 2006)
Schweden	*R. helvetica*	1,5- 17.3%	(Severinsson et al. 2010)
Schweiz	*gltA* Gen	9,9%	(Boretti et al. 2009)
	23S rRNA	11.7%	(Boretti et al. 2009)

Tab 6.2.1.

Prävalenzen von mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken in Europa

Eine saisonale Häufung der Infektionsrate konnte in den Monaten August/ September festgestellt werden, wobei dieser Trend statistisch nicht belegt werden konnte.

Hochsignifikant stellte sich der Unterschied der Prävalanz von *Rickettsia* spp. zwischen den Jahren 2006 und 2007 dar. Im Jahr 2006 waren doppelt so viele Zecken mit *Rickettsia* spp. infiziert wie 2007 (p=0,001). Klimatische Faktoren konnten dafür nicht eruiert werden. Eine Möglichkeit könnte eine veränderte Zusammensetzung der im Habitat lebenden kleinen Säugetiere darstellen, z.B. durch ein Ableben der zuvor infizierten Tiere oder die Bildung von protektiven Antikörpern gegen eine Rickettsiämie.

Der in dieser Arbeit dokumentierte signifikante Unterschied der Infektion von adulten *Ixodes ricinus* Zecken im Vergleich zu Nymphen mit *Rickettsia* spp. (2006: p = 0,01, 2007: p = 0,02) findet sich auch in vergleichbaren epidemiologischen Studien in Europa (siehe Tabelle 6.2.2). In den Publikationen von Sprong und Reye findet sich jedoch kein signifikanter Unterschied der Infektionsrate der verschiedenen Entwicklungsstadien (Sprong et al. 2009, Reye et al. 2010).

LITERATUR	WEIBCHEN	MÄNNCHEN	NYMPHEN
(Stanczak et al. 2009)	16,4%	8,4%	8,4%
(Silaghi et al. 2008)	6,8%	7,4%	1,3%
(Reye et al. 2010)	7,8%	5,3%	4,9%
(Halos et al. 2010) Wald Weide	 7,1% 8,7%	 5,7% 3,8%	 2,4% 2,2%

Tab 6.2.2.

Prävalenz von mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken (aufgeschlüsselt nach Entwicklungsstadium)

Der serologische Nachweis von Antikörpern gegen *Rickettsia* spp. variiert stark in den untersuchten Risikopopulationen (siehe Tab. 6.2.3.). Der häufige serologische Nachweis bei niedriger Infektionsrate könnte für ein blande verlaufendes Krankheitsbild oder auch für die effektive Therapie der Rickettsiose mit Doxycyclin als das am häufigsten verwendete Antibiotikum bei Borreliose sprechen (Parola und Raoult 2001).

LAND	PRÄVALENZ	KRITERIEN	LITERATUR
Dänemark	4%	A	(Lebech et al. 1998)
Dänemark	11,3%	A	(Nielsen et al. 2004)
Dänemark	41%	C	(Kidd et al. 2008)
Frankreich	9,2%	B	(Fournier et al. 2000)

Tab. 6.2.3.

Serologische Daten bezüglich des Nachweises von Antikörpern gegen *Rickettsia* spp. aus europäischen Staaten, hierbei wurden zum einen A: mit *Borrelia* spp. infizierte Menschen und B: Waldarbeiter als Angehörige einer Risikopopulation C: gesunde Blutspender untersucht

In der vorliegenden Arbeit wurde *Rickettsia helvetica* und *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* Zecken mit Hilfe der Sequenzierung eindeutig bestimmt.
Andere in Europa vorkommende Arten wie z.B. *R. aeschlimanni, R. slovaca, R. felis, R. raoulti, R. conorii, R. sibirica, R. slovaca* oder *R. akari* (Parola et al. 2005, Dobler und Wolfel 2009) konnten nicht nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit wäre das Fehlen der genannten Erreger im Untersuchungsgebiet. Zum anderen könnte es an einer fehlenden Speziesdifferenzierung der PCR liegen, da zur Erhöhung der Sensitivität ein hochkonservierter Abschnitt des Citratsynthasegens (*gltA*) verwandt wurde, welche sich innerhalb der verschiedenen *Rickettsia* spp. kaum unterscheidet.

6.3. Koinfektionen

Die im Rahmen dieser sowie der Promotionsarbeit von K. Paulicks (Paulicks 2009) aus 1000 *Ixodes ricinus* Zecken extrahierte DNA wurde auf Koinfektionen mit *Babesia* spp., *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., sowie die selten in *I. ricinus* vorkommenden Erreger *Coxiella burnetii* und *Francisella tularensis,* untersucht. Insgesamt waren 10% der infizierten *Ixodes ricinus* Zecken mehrfach infiziert. Dominierend stellten sich Koinfektionen mit *Borrelia* spp. und *Rickettsia* spp. dar, welche in 40 (4,0%) der untersuchten Zecken auftraten. Es waren 19 (0,19%) der 1000 *Ixodes ricinus* Zecken mit *Rickettsia* spp. und *Babesia* spp. und 16 (0,16%) mit *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp. koinfiziert. Desweiteren konnten erstmalig Infektionen von *Ixodes ricinus* Zecken mit *Coxiella burnetii* (1,9%) sowie Koinfektionen mit diesem Erreger nachgewiesen werden (Hildebrandt et al. 2011b, Hildebrandt 2011a, Hildebrandt et al. 2010b, Hildebrandt et al. 2010a).

Ixodes ricinus Zecken können Koinfektionen aquirieren indem sie während der Blutmahlzeit mehrere Erreger eines koinfizierten Wirtstieres aufnehmen. Eine andere Möglichkeit stellt die sequentielle Koinfektion durch zwei- bzw. dreizeitiges Saugen an jeweils lediglich einfach infizierten Wirtstieren dar (Levin und Fish 2000). Nymphen können sich somit prinzipiell nur simultan koinfizieren, was das geringere Vorkommen von Mehrfachinfektionen in Nymphen erklärt. Möglich ist eine metachrone Infektion der Nymphen durch eine transovarielle Infektion mit *Rickettsia* spp. und. nachfolgender Infektion mit einem weiteren Erreger beim Saugakt. Dies spiegelt sich in einer niedrigeren Koinfektionsrate der Nymphen, welche auch in der Arbeitsgruppe um Hildebrandt et al. nachgewiesen wurde, mit Koinfektionsraten von 51,4% bei Adulten und 33,3% bei Nymphen (Hildebrandt 2011a) wieder.

Koinfizierte *Ixodes ricinus* Zecken können während eines Saugaktes die Koinfektionen an Menschen weitergeben. Hierdurch erhöht sich das Risiko einer Mehrfachinfektion für den Menschen, welche meist komplikationsträchtiger verläuft. In einer umfassenden Studie von Krause et al. fand sich ein langwierigerer Krankheitsverlauf und das Auftreten schwerwiegender Symptome bei humanen Mischinfektionen mit *Babesia* spp. und *Borrelia* spp. (Krause et al. 1996). Es ist bekannt, dass Koinfektionen mit *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp.

schwerwiegender verlaufen, da die durch *Anaplasma* spp. infizierten neutrophilen Granulozyten Metalloproteinasen sezernieren (Swanson et al. 2006). Diese wirken proinflammatorisch und erhöhen dadurch die Permeabilität der Blut- Hirn-Schranke. Diese Pathophysiologie begünstigt das Auftreten schwerer cerebraler Borrelieninfektionen. Ebenfalls lysiert *Anaplasma* spp. die infizierten neutrophilen Granulozyten und die Immunabwehr wird zum einen durch einen Mangel dieser Abwehrzellen der ersten Stunde sowie durch die Beseitigung des nekrotischen Material geschwächt (Grab et al. 2007).

Cinco et al. wies 1997 erstmalig eine Koinfektion in *Ixodes ricinus* Zecken in Europa nach. Die von ihm untersuchten Zecken waren zu 8,14% mit *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp. koinfiziert (Cinco et al. 1997). Die weltweit erste Dreifachinfektion in *Ixodes ricinus* beschrieb die Arbeitsgruppe um Skotarczak 2003 in Polen, 0,6% der untersuchten Zecken waren mit *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. und *Borrelia* spp. infiziert (Skotarczak et al. 2003). Die Pathogene können unabhängig voneinander innerhalb der Zecke zirkulieren und individuelle Bakteriämien verursachen (Popov et al. 2007). Die Tab. 6.3. stellt Daten europäischer Arbeitsgruppen zur Prävalenz von Koinfektionen in *Ixodes ricinus* Zecken dar.

	R	A	BA	BO	R/ BO	A/ BA	A/ BO	A/ R/ BO	A/ BO/ BA
(Cinco et al. 1997)		24,4%		19,8%			8,14%		
(Fingerle et al. 1999)		1,6%		36,2%			0,8%		
(Piccolin et al. 2006)	1,6%	4,4%	1,6%	8,23%			1,2%	0,1%	0,5%
(Skotarczak et al. 2003)		4,5%	13,3%	16,7%		0,7%	1,3%		0,6%
(Reye et al. 2010)	5,1%	1,9%	2,7%	11,3%	0,5%				0,1%
(Baumgarten et al. 1999)		2,2%		21,8%			0,7%		
(Leutenegger et al. 1999)		2%		49%			2%		
(Stanczak et al. 2004)		14%	2,3%	12,4%		2%	8,3%		
(Wojcik-Fatla et al. 2009)		4,9%	3,5%	4,9%		1,1%	1%		0,1%

Tab. 6.3.

Zusammenstellung der Prävalenz von Koinfektionen in *Ixodes ricinus* Zecken mit den in der Arbeit untersuchten Erregern *Rickettsia* spp. und *Anaplasma* spp. in Europa A = *Anaplasma* spp., BA = *Babesia* spp., BO = *Borrelia* spp., R = *Rickettsia* spp.

6.4. Diskussion der Methoden

6.4.1. Kritische Betrachtung der verwendeten Methoden

Entsprechend einer von Schwartz et al. ausgesprochenen Empfehlung verwendeten wir nüchterne Zecken um eine Inhibition der PCR durch die Blutmahlzeit zur vermeiden. Der Autor stellte fest, dass das gesaugte Blut zu falsch niedrigen Ergebnissen führen kann (Schwartz et al. 1997), da es u.a. DNA spaltente Enzyme enthält. Entgegen dieser Empfehlung wäre die Untersuchung von saugenden Zecken auf den im Habitat lebenden Säugetieren mit serologischer Untersuchung des Infektionsstatus der potentiellen Wirte interessant. Hierdurch könnte man die Wahrscheinlichkeit der Erregerübertragung während des Saugaktes feststellen. Zu diskutieren ist, ob durch Ermittlung der Erregerlast mittels quantitativer PCR die Wahrscheinlichkeit einer Erregerübertragung beim Saugakt prognostiziert werden kann.

PCR von *Anaplasma phagocytophilum*

Die in dieser Arbeit von Hildebrandt et al. 2002 etablierten Primer (Ap16 S1v und Ap16 S1r) ermöglichten eine zuverlässige Amplifikation des gewünschten Abschnittes innerhalb der 16S DNA. Bei der Untersuchung der ersten 300 Proben auf *Anaplasma* spp. führten wir zur Steigerung der Sensitivität eine *semi- nested* PCR durch, welche im Vergleich zur konventionellen PCR keine zusätzlichen positiven Befunde erbrachte. Nach weiterführender Analyse zeigten sich 7,2% der in der konventionellen PCR positiv erscheinenden Produkte in Restriktionsverdau und/ oder Sequenzierung falsch positiv. Die falsch positiven Befunde erschienen retrospektiv bereits in der PCR als fraglich positiv mit schwachem Produkt und unkorrekter Größenspezifität. Desweiteren wurde die PCR zu Gunsten einer hohen Sensitivität optimiert, was eine niedrigere Spezifität bedingte.

Eine Standardisierung speziesspezifischer Primer wäre anzustreben, um eine verbesserte Vergleichbarkeit der ermittelten Daten zu gewährleisten. Eine solche Vereinheitlichung birgt jedoch das Risiko interessante Aspekte verschiedener Gene, welche durch die Nutzung vielfältiger Zielsequenzen aufgezeigt werden, nicht mehr nachweisen zu können.

PCR von *Rickettsia* spp.

Im Rahmen dieser Arbeit verwendeten wir die von Nilsson et al. etablierten Primer (RH 314 vorwärts und RH 654 rückwärts) zum Nachweis eines Abschnittes des Citratsynthasegens (Nilsson et al. 1999a).

Aufgrund des genetisch geringen Unterschiedes zwischen den einzelnen *Rickettsia* spp. konnten auch mit den Primern RH 314 und RH 645 36% der nachgewiesenen *Rickettsia* spp. nicht weiter spezifiziert werden.

In der weiterführenden Analyse zeigten sich 32,5% der in der PCR als positiv gewerteten Produkte falsch positiv. Die Ursache der geringen Spezifität kann möglicherweise durch die Hinzunahme von 153 nur fraglich positiven Produkten bei Restriktionsverdau und Sequenzierung erklärt werden. Eine Erklärung wäre eine hohe Sensitivität und niedrige Spezifität der verwendeten PCR. Zur Erhöhung der Spezifität sollte geprüft werden, ob eine Reduktion der Zyklenanzahl und/ oder einer Erhöhung der Annealing Temperatur die Rate falsch positiver Ergebnisse reduziert.

Die Primer RH 314 und RH 654 sind bezüglich der Detektion von *R. monacensis* dem *rOmpA* - Gen (Primer: Rr 190.70p- Rr190.602n) unterlegen, können jedoch im Gegensatz zum *rOmpA* Gens *R. helvetica* (Simser et al. 2002) nachweisen. In der Real-time PCR zeigt sich das Gen der Citratsynthase sensitiver als das *rOmpA* Gen und setzt zum Erregernachweis lediglich das Vorhandensein 1 Kopie Target DNA pro 25 µl Reaktionsgemisch im Vergleich zu 10 Kopien bei Verwendung des *rOmpA* Gens voraus (Stenos et al. 2005). Eine neue Möglichkeit zur Detektion von *R. helvetica* ist die Durchführung einer Real- time PCR des 23S rRNA Gens. Die Züricher Arbeitsgruppe um Boretti et al. untersuchte Zecken, welche zuvor an Hunden und Katzen saugten. Die extrahierte DNA wurde jeweils mittels Real-time PCR auf 23S rRNA und das Citratsynthase Gen untersucht. Die 23S rRNA erwies sich als sensitiver im Vergleich zum Citratsynthase Gen. Die hundesaugenden Zecken waren zu 18% (*gltA* DNA) bzw. 28% (23S rRNA) und die Katzensaugenden Zecken zu 41% (*gltA* DNA) bzw. 50% (23S rRNA) mit *R. helvetica* infiziert (Boretti et al. 2009).

6.4.2. Diskussion der Fragestellung

Aufgrund der vermutlich geringen Pathogenität, der in dieser Arbeit untersuchten Erreger kann die klinische Bedeutung einer Dokumentation asymptomatischer Infektionen diskutiert werden. Jedoch stellt die Ermittlung der Prävalenz dieser intrazellulären Bakterien in ihren Hauptvektoren den ersten wichtigen Schritt zur Herstellung einer epidemiologischen Landkarte dar. Diese benötigen klinisch tätige Ärzte zur Einschätzung des Erkrankungsrisikos bei Patienten mit atypischer fieberhafter Infektion. Die vorliegende Arbeit konnte eine hohe Prävalenz von *Rickettsia* spp. und geringere Prävalenz von *Anaplasma* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken in Thüringen feststellen. Bei atypisch verlaufenden fieberhaften Infektionen ohne das Vorhandensein eines Infektfocus sollte in Thüringen die Durchführung einer PCR zum Nachweis von *Anaplasma* spp., *Rickettsia.* spp., *Babesia* spp. und *Borrelia* spp. in die Diagnostik eingeschlossen werden. Außerdem muss auch an Infektionen durch seltenere Erreger wie z. B. *C. burnetii* gedacht werden. Erregerspezifische PCR- Methoden sind in der Literatur durch verschiedene Arbeitsgruppen etabliert und beschrieben. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinkums Jena, dem Friedrich-Löffler-Institut Jena und dem nationalen Referenzlabor für Tularämie in München sind eine Vielzahl der Protokolle von Nilsson et al. 1999a, Hildebrandt et al. 2002, Hartelt et al. 2004, Michel et al. 2004, Lencakova et al. 2006, Klee et al. 2006, Kaysser et al. 2008) etabliert.

Als Risikopatienten gelten immunsupprimierte Patienten sowie Empfänger von Blutprodukten, da die Übertragung von *Anaplasma* spp. oder auch *Babesia* spp. durch Blutprodukte möglich ist (Kemperman M. 2008, Hildebrandt et al. 2007).

Zum Erregernachweis eignet sich eine Multiplex PCR, welche zügig und kostengünstig Koinfektionen mit *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp. und *Borrelia* spp. nachweist (Halos et al. 2006). Diese ist bislang nur an aus Zecken gewonnen Proben validiert, so dass eine Multiplex PCR für Proben von Menschen noch etabliert werden sollte. Da gerade bei untypisch verlaufenden Infektionen eine Koinfektion vorliegen kann, ist der Ausschluss von Mehrfachinfektionen notwendig (Sexton et al. 1998).

In der Literatur sind bisher keine prospektiven Studien publiziert, welche die Pathogenität und immunologischen Ereignisse von Koinfektionen im Menschen beschreiben. Im experimentellen Setting und anhand einzelner Fallberichte kann jedoch vermutet werden, dass Koinfektionen mit *Borrelia* spp. und *Anaplasma* spp. bzw. *Anaplasma* spp. und *Babesia* spp. schwerwiegender als die jeweiligen Einzelinfektionen verlaufen (Grab et al. 2007, Krause et al. 1996, Swanson et al. 2006).

6.4.3. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen das Vorhandensein von *Anaplasma* spp. und *Rickettsia* spp., sowie Koinfektionen mit beiden Erregern in Freilandzecken auf. Eine kostengünstige und zeiteffektive Methode zum Nachweis dieser und anderer Infektionserreger wie z.B. *Borrelia* spp. ist die Durchführung einer Multiplex PCR, z.B. von (Halos et al. 2006), als Screening Untersuchung. Patienten mit unklaren fieberhaften Infekten sollten ebenso wie Blutprodukte vor Transfusion bei immunsupprimierten Patienten auf das Vorhandensein von intrazellulären Bakterien geprüft werden. Zur Durchführung eignet sich ein Gen, welches in den zu untersuchenden Bakterien ubiquitär enthalten ist, zum Beispiel im Bereich der 16S rDNA. Eine Ausnahme bildet hier *Babesia* spp., welche als Parasit keine 16S rDNA, sondern eine 18S rDNA aufweist, so dass eine separate PCR angewandt werden muss.

Zur Durchführung einer Multiplex- PCR eignet sich eine TTGE (*temporal temperature gradient gel electrophoresis*), welche die Amplifikate nach ihrem GC-Gehalt auftrennt. Mittels Sequenzierung kann anschließend der oder die Erreger identifiziert werden (Halos et al. 2006). Diese Methode wird bereits erfolgreich an Zecken durchgeführt, Gegenstand aktueller Forschung ist die Etablierung an Proben von Menschen.

Die Arbeitsgruppe um Courtney etablierte eine Multiplex PCR für *Borrelia* spp. und *Anaplasma phagocytophilum,* welche die 23S rRNA von *Borrelia* spp. und das sehr selektive *msp2* Gen von *A. phagocytophilum* amplifiziert (Courtney et al. 2004).

Der Ansatz der Multiplex PCR von Halos et al. sieht die Amplifikation der 16S rDNA vor, welche in *Anaplasma* spp*., Borrelia* spp. sowie *Rickettsia* spp. ubiquitär vorhanden ist (Halos et al. 2006).

Desweiteren sollten zur Vermeidung einer Übertragung von *Rickettsia* spp. oder *Anaplasma* spp. Filtersysteme bei Transfusion von Blutbestandteilen verwandt werden. Dadurch könnte eine iatrogene Infektion, wie z.B. in Minnesota, USA, beschrieben, vermieden werden (Eastlund 1999).

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig gleichzeitig die Prävalenz von *Anaplasma* spp. und *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* in Thüringen. Desweiteren wurde die extrahierte DNA auf weitere zeckenassoziierte Erreger (*Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Coxiella burnetii* und *Francisella tularensis*) untersucht, so dass erstmals eine komplexe Übersicht über eine Vielzahl von Erregern und entsprechenden Koinfektionen aus einem Untersuchungsgebiet in Deutschland möglich wurde. Dies ist möglich, da jede einzelne der gefangenen Zecken separat den PCR- Protokollen zugeführt wurde. Mit Hilfe dieser Daten kann eine Risikoeinschätzung bezüglich der Wahrscheinlichkeit einer Infektion eines dieser Erreger bei Verdachtsfällen erfolgen und ggf. eine frühzeitige zielgerichtete Therapieeinleitung angeschlossen werden. Die ermittelten Prävalenzen liegen mit 14,7% für *Rickettsia* spp. und 4,7% für *A. phagocytophilum* im deutschlandweiten Durchschnitt (siehe Tab. 6.1.1. und Tab. 6.2.1.). Der nächste Schritt ist nun die Erhebung serologischer Daten von stark exponierten Personen wie Waldarbeiter und Joggern. Eine Aufklärung vor allem der Hausärzte, als auch Weiterbildungsmaßnahmen bezüglich der Vermeidung von Zeckenexpositionen und dem Erkennen der ersten klinischen Symptome könnten ebenfalls zur Vermeidung bzw. frühzeitgem Erkennen von zeckenassoziierten Infektionen dienen. Bei anamnestisch erhobener Exposition gegenüber Zecken und v.a. klinischen Symptomen wie z.B. Fieber, Erythem und Blutbildveränderungen sollte vor Beginn einer antibiotischen Therapie Blut zur Analyse mittels erregerspezifischer PCRs entnommen werden. Somit könnten auch Koinfektionen zügig entdeckt werden. Zur Transfusion von immunsupprimierten Patienten empfiehlt sich die Verwendung von leukozytendepletierten Blutprodukten, um potentiell letal verlaufende parenterale Infektionen zu vermeiden. Eine Ausnahme bildet *Babesia* spp., welche als Parasit intraerythrozytär vorkommt, so dass individuell nach Abwägung von Kosten- Nutzen- Aspekten ein Screening von Blutprodukten mit Hilfe der PCR auf Kontamination mit *Babesia* spp. erfolgen könnte. In den USA ist dies bereits klinische Praxis, da hier jährlich bis zu 80 Fälle von transfusionsassoziierter humaner Babesiose berichtet werden (Leiby 2006).
In dieser Arbeit fiel ein hochsignifikanter Unterschied der Prävalenz von *Rickettsia* spp. in den Jahren 2006 zu 2007 auf ($p < 0{,}001$), welcher bezüglich der Infektion

mit *Anaplasma* spp. nicht gefunden werden konnte. Zur weiterführenden epidemiologischen Untersuchung sollte die Prävalenz der beiden Erreger in den im Habitat lebenden Wirtstieren molekularbiologisch, aber auch serologisch untersucht werden, um saisonale Schwankungen zu erkennen und die Lebensweise der intrazellulären Erreger besser zu verstehen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um Vektoren und Reservoire der einzelnen Erreger zu identifizieren und Interaktionen in den Transmissionszyklen zu erkennen.

8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

A Conor AB. 1910. Une fievre eruptive observee in Tunisie. Bull Soc Pathol Exot, 8:492-496.

Aguero-Rosenfeld ME. 2002. Diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis*:* state of the art. Vector Borne Zoonotic Dis, 2 (4):233-239.

Arguin PM, Singleton J, Rotz LD, Marston E, Treadwell TA, Slater K, Chamberland M, Schwartz A, Tengelsen L, Olson JG, Childs JE. 1999. An investigation into the possibility of transmission of tick-borne pathogens via blood transfusion. Transfusion-Associated Tick-Borne Illness Task Force. Transfusion, 39 (8):828-833.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? Jama, 272 (3):212-218.

Bakken JS, Dumler JS. 2000. Human granulocytic ehrlichiosis. Clin Infect Dis, 31 (2):554-560.

Bakken JS, Dumler JS. 2006. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis*.* Ann N Y Acad Sci, 1078:236-247.

Baumgarten BU, Rollinghoff M, Bogdan C. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *granulocytic* and *monocytic ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. J Clin Microbiol, 37 (11):3448-3451.

Beati L, Peter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D. 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica sp. nov.* is a distinct species of the *spotted fever group of rickettsiae*. Int J Syst Bacteriol, 43 (3):521-526.

Belozerov VN. 1982. Diapause and Biological Rhythms in Ticks. Physiologie of ticks:469-500.

Beninati T, Lo N, Noda H, Esposito F, Rizzoli A, Favia G, Genchi C. 2002. First detection of *spotted fever group rickettsiae* in *Ixodes ricinus* from Italy. Emerg Infect Dis, 8 (9):983-986.

Blanco JR, Oteo JA. 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Clin Microbiol Infect, 8 (12):763-772.

Boretti FS, Perreten A, Meli ML, Cattori V, Willi B, Wengi N, Hornok S, Honegger H, Hegglin D, Woelfel R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2009. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. Appl Environ Microbiol, 75 (10):3230-3237.

Bouguer P. 1729. Essai d'optique, Sur la gradation de la lumière. Claude Jombert:S. 164ff.

Brouqui P, Parola P, Fournier PE, Raoult D. 2007. *Spotted fever rickettsioses* in southern and eastern Europe. FEMS Immunol Med Microbiol, 49 (1):2-12.

Brumpt E. 1932. Longévité du virus de la fièvre boutonneuse (*Rickettsia conori, n. sp.*) chez la Tique *Rhicephalus sanguineus* Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie Filiales, 110:1199- 1202.

Burgdorfer W, Brinton LP. 1975. Mechanisms of transovarial infection of s*potted fever Rickettsiae* in ticks. Ann N Y Acad Sci, 266:61-72.

Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol, 32 (3):589-595.

Chmielewska-Badora J, Zwolinski J, Cisak E, Wojcik-Fatla A, Buczek A, Dutkiewicz J. 2007. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks determined by polymerase chain reaction with two pairs of primers detecting 16S rRNA and ankA genes. Ann Agric Environ Med, 14 (2):281-285.

Chmielewski T, Podsiadly E, Karbowiak G, Tylewska-Wierzbanowska S. 2009. *Rickettsia spp*. in ticks, Poland. Emerg Infect Dis, 15 (3):486-488.

Chochlakis D, Psaroulaki A, Kokkini S, Kostanatis S, Arkalati E, Karagrannaki E, Tsiatis K, Tselentis Y, Gikas A. 2009. First evidence of *Anaplasma* infection in Crete, Greece. Report of six human cases. Clin Microbiol Infect, 15 Suppl 2:8-9.

Christova IS, Dumler JS. 1999. Human granulocytic ehrlichiosis in Bulgaria. Am J Trop Med Hyg, 60 (1):58-61.

Cinco M, Padovan D, Murgia R, Maroli M, Frusteri L, Heldtander M, Johansson KE, Engvall EO. 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia* b*urgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. J Clin Microbiol, 35 (12):3365-3366.

Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwolinski J, Wojcik-Fatla A, Polak J, Dutkiewicz J. 2005. Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-eastern Poland). Ann Agric Environ Med, 12 (1):127-132.

Clopper CJ PE. 1934. The use of confidence fiducal limits illustrated in the case of binomial. biometra, 26:404- 413.

Cotte V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M. 2010. Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. Vector Borne Zoonotic Dis, 10 (8):723-730.

Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol, 42 (7):3164-3168.

De La Fuente J, Vicente J, Hofle U, Ruiz-Fons F, Fernandez De Mera IG, Van Den Bussche RA, Kocan KM, Gortazar C. 2004. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. Vet Microbiol, 100 (3-4):163-173.

De la Fuente J, Torina A, Naranjo V, Caracappa S, Di Marco V, Alongi A, Russo M, Maggio AR, Kocan KM. 2005a. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: case report. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 4:15.

De La Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Hofle U, Fernandez De Mera IG, Villanua D, Almazan C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortazar C. 2005b. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. Vector Borne Zoonotic Dis, 5 (4):390-401.

De Sousa R, Barata C, Vitorino L, Santos-Silva M, Carrapato C, Torgal J, Walker D, Bacellar F. 2006. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. Emerg Infect Dis, 12 (7):1103-1108.

Derdakova M, Halanova M, Stanko M, Stefancikova A, Cislakova L, Pet'ko B. 2003. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. Ann Agric Environ Med, 10 (2):269-271.

Dobler G, Wolfel R. 2009. Typhus and other rickettsioses: emerging infections in Germany. Dtsch Arztebl Int, 106 (20):348-354.

Donatien L. 1935. Existence en Algerie d'une *rickettsia du chien.* Bull Soc Pathol Exot, 28:418- 419.

Dugan VG, Yabsley MJ, Tate CM, Mead DG, Munderloh UG, Herron MJ, Stallknecht DE, Little SE, Davidson WR. 2006. Evaluation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as natural sentinels for *Anaplasma phagocytophilum*. Vector Borne Zoonotic Dis, 6 (2):192-207.

Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R, Granstrom M. 1997. A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. J Infect Dis, 175 (3):720-722.

Dumler JS, Bakken JS. 1998. Human ehrlichioses*:* newly recognized infections transmitted by ticks. Annu Rev Med, 49:201-213.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of

Ehrlichia with *Anaplasma, Cowdria* with *Ehrlichia* and E*hrlichia* with *Neorickettsia,* descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and '*HGE agent'* as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol, 51 (Pt 6):2145-2165.

Dumler JS. 2002. Notification list. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 51, part 6, of the IJSEM. Int J Syst Evol Microbiol, 52 (Pt 1):5-6

Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. 2007. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin Infect Dis, 45 Suppl 1:S45-51.

Eastlund P. 1999. Human granulocytic ehrlichiose after red cell transfusion. Transfusion, 39:117.

Ferquel E, Garnier M, Marie J, Bernede-Bauduin C, Baranton G, Perez-Eid C, Postic D. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and Anaplasmataceae members in I*xodes ricinus* ticks in Alsace, a focus of Lyme borreliosis endemicity in France. Appl Environ Microbiol, 72 (4):3074-3078.

Fingerle V, Goodman JL, Johnson RC, Kurtti TJ, Munderloh UG, Wilske B. 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. J Clin Microbiol, 35 (12):3244-3247.

Fingerle V, Munderloh UG, Liegl G, Wilske B. 1999. Coexistence of *ehrlichiae* of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. Med Microbiol Immunol, 188 (3):145-149.

Fourie LJ, van der Lingen F, Kok DJ. 1995. Improvement of field sampling methods for adult Karoo paralysis ticks, *Ixodes rubicundus* (Acari: Ixodidae), through addition of host odour. Exp Appl Acarol, 19 (2):93-101.

Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. Emerg Infect Dis, 6 (4):389-392.

Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Brouqui P, Raoult D. 2004. Aneruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. J Clin Microbiol, 42 (2):816-818.

Grab DJ, Nyarko E, Barat NC, Nikolskaia OV, Dumler JS. 2007. *Anaplasma phagocytophilum-Borrelia burgdorferi* coinfection enhances chemokine, cytokine, and matrix metalloprotease expression by human brain microvascular endothelial cells. Clin Vaccine Immunol, 14 (11):1420-1424.

Gray JS. 1991. The development and seasonal acitivity of the tick *Ixodes ricinus*. Med Vet Entomol, 79:323- 333.

Gray JS. 2002. Biology of Ixodes species ticks in relation to tick-borne zoonoses. Wien Klin Wochenschr, 114 (13-14):473-478.

Grzeszczuk A, Stanczak J, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Lozowska W, Prokopowicz D. 2004. Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. Ann Agric Environ Med, 11 (1):99-103.

Grzeszczuk A, Stanczak J. 2006a. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. Ann N Y Acad Sci, 1078:309-311.

Grzeszczuk A, Stanczak J. 2006b. High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. Ann Agric Environ Med, 13 (1):45-48.

Grzeszczuk A, Puzanowska B, Zirako S. 2009. *Anaplasma phagocytophilum* infection in patients with early Lyme borreliosis, erythema migrans, in north-eastern Poland. Clin Microbiol Infect, 15 Suppl 2:17-18.

Grzeszczuk A, Karbowiak G, Ziarko S, Kovalchuk O. 2006. The root-vole *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776): a new potential reservoir of *Anaplasma phagocytophilum.* Vector Borne Zoonotic Dis, 6 (3):240-243.

Gurvich AE, Gorodetsky SI, Sidorova EV. 1967. The interaction between nucleic acids, histones and other proteins in agarose. Biochim Biophys Acta, 138 (3):499-505.
Guy E, Tasker S, Joynson DH. 1998. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in UK ticks using polymerase chain reaction. Epidemiol Infect, 121 (3):681-683.
Halos L, Mavris M, Vourc'h G, Maillard R, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M. 2006. Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. Vet Res, 37 (2):245-253.
Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G. 2010. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. Appl Environ Microbiol, 76 (13):4413-4420.
Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum (Ehrlichia sp.)*, *Wolbachia sp., Rickettsia sp.,* and *Babesia sp.* in Southern Germany. Int J Med Microbiol, 293 Suppl 37:86-92.
Hayes SF, Burgdorfer W, Aeschlimann A. 1980. Sexual transmission of *spotted fever group rickettsiae* by infected male ticks: detection of *rickettsiae* in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. Infect Immun, 27 (2):638-642.
Hildebrandt A, Schmidt KH, Fingerle V, Wilske B, Straube E. 2002. Prevalence of *granulocytic Ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany (Thuringia) detected by PCR and sequencing of a 16S ribosomal DNA fragment. FEMS Microbiol Lett, 211 (2):225-230.
Hildebrandt A, Hunfeld KP, Baier M, Krumbholz A, Sachse S, Lorenzen T, Kiehntopf M, Fricke HJ, Straube E. 2007. First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 26 (8):595-601.
Hildebrandt A, Pauliks K, Sachse S, Straube E. 2010a. Coexistence of *Borrelia spp*. and *Babesia spp*. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis, 10 (9):831-837.
Hildebrandt A, Straube E, Neubauer H, Schmoock G. 2010b. *Coxiella burnetii* and Coinfections in *Ixodes ricinus* Ticks in Central Germany. Vector Borne Zoonotic Dis.
Hildebrandt A, Franke J., Schmoock G., Paulicks K., Krämer A., Straube E. 2011a. Diversity and Coexistence of Tick- borne Pathogens in Central Germany. J Med Entomol 48 (3):651- 655.
Hildebrandt A, Fritzsch J, Franke J, Sachse S, Dorn W, Straube E. 2011b. Co-circulation of Emerging Tick-Borne Pathogens in Middle Germany. Vector Borne Zoonotic Dis.
Hillyard PD. 1996. Ticks of North-West Europe.
Horowitz HW, Kilchevsky E, Haber S, Aguero-Rosenfeld M, Kranwinkel R, James EK, Wong SJ, Chu F, Liveris D, Schwartz I. 1998. Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. N Engl J Med, 339 (6):375-378.
Jado I, Oteo JA, Aldamiz M, Gil H, Escudero R, Ibarra V, Portu J, Portillo A, Lezaun MJ, Garcia-Amil C, Rodriguez-Moreno I, Anda P. 2007. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. Emerg Infect Dis, 13 (9):1405-1407.
Jenkins, Kristiansen K, Allum. 2001. *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia spp*. in *Ixodes ticks* from southern Norway. J Clin Microbiol, 39:3666- 3671.
Jones LD, Davies CR, Steele GM, Nuttall PA. 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. Science, 237 (4816):775-777.
Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R. 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi sensu lato* for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zentralbl Bakteriol, 287 (1-2):41-52.
Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE, Telford SR, 3rd. 1998. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. J Infect Dis, 177 (5):1422-1425.

Kaysser P, Seibold E, Matz-Rensing K, Pfeffer M, Essbauer S, Splettstoesser WD. 2008. Re-emergence of tularemia in Germany: presence of *Francisella tularensis* in different rodent species in endemic areas. BMC Infect Dis, 8:157.

Kemperman M. ND. 2008. *Anaplasma phagocytophilum* transmitted through blood transfusion--Minnesota, 2007. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 57 (42):1145-1148.

Kidd L, Maggi R, Diniz PP, Hegarty B, Tucker M, Breitschwerdt E. 2008. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of *Spotted Fever Group Rickettsia* in dog blood. Vet Microbiol, 129 (3-4):294-303.

Klee SR, Tyczka J, Ellerbrok H, Franz T, Linke S, Baljer G, Appel B. 2006. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii.* BMC Microbiol, 6:2.

Krause PJ, Telford SR, 3rd, Spielman A, Sikand V, Ryan R, Christianson D, Burke G, Brassard P, Pollack R, Peck J, Persing DH. 1996. Concurrent Lyme disease and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. Jama, 275 (21):1657-1660.

La Scola B, Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. J Clin Microbiol, 35 (11):2715-2727.

Lebech AM, Hansen K, Pancholi P, Sloan LM, Magera JM, Persing DH. 1998. Immunoserologic evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Danish patients with Lyme neuroborreliosis. Scand J Infect Dis, 30 (2):173-176.

Leiby DA. 2006. Babesiosis and blood transfusion: flying under the radar. Vox Sang, 90 (3):157-165.

Lencakova D, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi s.l. OspA* types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. Int J Med Microbiol, 296 Suppl 40:108-118.

Leutenegger CM, Pusterla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H. 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and the *human granulocytic ehrlichiosis agent* in Switzerland. J Clin Microbiol, 37 (10):3390-3391.

Levin ML, Fish D. 2000. Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* ticks. Infect Immun, 68 (4):2183-2186.

Liz, Anderes, Sumner JW. 2001. PCR detection of g*ranulocytic ehrlichiae* in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. J Clin Microbiol, 38 1002-1007.

Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T, Strle F. 2003. *Human granulocytic ehrlichiosis* in Slovenia. Ann N Y Acad Sci, 990:279-284.

Maeda K, Markowitz N, Hawley RC, Ristic M, Cox D, McDade JE. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic *rickettsia*. N Engl J Med, 316 (14):853-856.

Massung RF, Slater KG. 2003. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol, 41 (2):717-722.

Masuzawa T, Kharitonenkov IG, Okamoto Y, Fukui T, Ohashi N. 2008. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and its coinfection with *Borrelia afzelii i*n *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks inhabiting Tver Province (Russia) - a sympatric region for both tick species. J Med Microbiol, 57 (Pt 8):986-991.

Maxey E. 1899. Some Observations of on the So- Called Spotted Fever of Idaho. Medical Sentinal.

Mediannikov O, Matsumoto K, Samoylenko I, Drancourt M, Roux V, Rydkina E, Davoust B, Tarasevich I, Brouqui P, Fournier PE. 2008. *Rickettsia raoultii sp. nov.*, a *spotted fever group rickettsia* associated with *Dermacento*r ticks in Europe and Russia. Int J Syst Evol Microbiol, 58 (Pt 7):1635-1639.

Mettille FC, Salata KF, Belanger KJ, Casleton BG, Kelly DJ. 2000. Reducing the risk of transfusion-transmitted rickettsial disease by WBC filtration, using *Orientia tsutsugamushiin* a model system. Transfusion, 40 (3):290-296.

Michel H, Wilske B, Hettche G, Gottner G, Heimerl C, Reischl U, Schulte-Spechtel U, Fingerle V. 2004. An *ospA*-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi sensu lato* species and *OspA* types. Med Microbiol Immunol, 193 (4):219-226.

Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. 1991. First European case of ehrlichiosis. Lancet, 338 (8767):633-634.

Moshkovski SD. 1945. Cytotropic inducers of infection and the classification of the *Rickettsia* with *Chlamydozoa.* Adv Mod Biol, 19:1- 44.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 51 Pt 1:263-273.

Nielsen H, Fournier PE, Pedersen IS, Krarup H, Ejlertsen T, Raoult D. 2004. Serological and molecular evidence of *Rickettsia helvetica* in Denmark. Scand J Infect Dis, 36 (8):559-563.

Nilsson K, Lindquist O, Liu A. 1999a. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. J Clin Microbiol, 37:400- 403.

Nilsson K, Lindquist O, Pahlson C. 1999b. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet, 354 (9185):1169-1173.

Nilsson K, Pahlson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O. 2002. Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. J Infect Dis, 185 (8):1128-1138.

Nilsson K, Liu A, Pahlson C, Lindquist O. 2005. Demonstration of intracellular microorganisms (*Rickettsia spp., Chlamydia pneumoniae, Bartonella spp.*) in pathological human aortic valves by PCR. J Infect, 50 (1):46-52.

Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. 1998. *Granulocytic Ehrlichia* infection in *ixodid ticks* and mammals in woodlands and uplands of the U.K. Med Vet Entomol, 12 (4):423-429.

Oster CN, Burke DS, Kenyon RH, Ascher MS, Harber P, Pedersen CE, Jr. 1977. Laboratory-acquired Rocky Mountain spotted fever. The hazard of aerosol transmission. N Engl J Med, 297 (16):859-863.

Parola P, Beati L, Cambon M, Raoult D. 1998. First isolation of *Rickettsia helvetica* from *Ixodes ricinus* ticks in France. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 17 (2):95-100.

Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis, 32 (6):897-928.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev, 18 (4):719-756.

Paulicks K. 2009. Prävalenz von *Borrelia burgdorferi sensu lato* und *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken im Naherholungsgebiet Zeitzgrund in Thüringen [Promotion].

Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS. 1997. Human disease in Europe caused by a *granulocytic Ehrlichia* species. J Clin Microbiol, 35 (6):1556-1559.

Petrovec M, Sumner JW, Nicholson WL, Childs JE, Strle F, Barlic J, Lotric-Furlan S, Avsic Zupanc T. 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 (1):209-210.

Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. 1978. Serologic typing of *rickettsiae* of the spotted fever group by microimmunofluorescence. J Immunol, 121 (5):1961-1968.

Piccolin G, Benedetti G, Doglioni C, Lorenzato C, Mancuso S, Papa N, Pitton L, Ramon MC, Zasio C, Bertiato G. 2006. A study of the presence of *B. burgdorferi, Anaplasma* (previously *Ehrlichia) phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in I*xodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. Vector Borne Zoonotic Dis, 6 (1):24-31.

Pierard D, Levtchenko E, Dawson JE, Lauwers S. 1995. Ehrlichiosis in Belgium. Lancet, 346 (8984):1233-1234.
Planck A, Eklund A, Grunewald J, Vene S. 2004. No serological evidence of *Rickettsia helvetica* infection in Scandinavian sarcoidosis patients. Eur Respir J, 24 (5):811-813.
Polin H, Hufnagl P, Haunschmid R, Gruber F, Ladurner G. 2004. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. J Clin Microbiol, 42 (5):2285-2286.
Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J Med Microbiol, 47 (3):235-251.
Popov VL, Korenberg EI, Nefedova VV, Han VC, Wen JW, Kovalevskii YV, Gorelova NB, Walker DH. 2007. Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia, Borrelia,* and a flavivirus. Vector Borne Zoonotic Dis, 7 (4):699-716.
Portillo A, Santos AS, Santibanez S, Perez-Martinez L, Blanco JR, Ibarra V, Oteo JA. 2005. Detection of a non-pathogenic variant of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from La Rioja, Spain. Ann N Y Acad Sci, 1063:333-336.
Psaroulaki A, Koliou M, Chochlakis D, Ioannou I, Mazeri S, Tselentis Y. 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a child. Pediatr Infect Dis J, 27 (7):664-666.
Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB. 1999. Evidence of the *human granulocytic ehrlichiosis agent* in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. J Clin Microbiol, 37:1332-1334.
Raoult D, Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev, 10 (4):694-719.
Raoult D, Fournier PE, Abboud P, Caron F. 2002. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. Emerg Infect Dis, 8 (7):748-749.
Reif KE, Macaluso KR. 2009. Ecology of *Rickettsia felis:* a review. J Med Entomol, 46 (4):723-736.
Remy V, Hansmann Y, De Martino S, Christmann D, Brouqui P. 2003. Human anaplasmosis presenting as atypical pneumonitis in France. Clin Infect Dis, 37 (6):846-848.
Reye AL, Hubschen JM, Sausy A, Muller CP. 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Appl Environ Microbiol, 76 (9):2923-2931.
Ricketts HT. 1906. A summery of investigation of the nature and means of transmission of rocky mountain spotted fever. Contributions to Medical Science by Howard Taylor Ricketts.
Rikihisa Y. 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev, 4 (3):286-308.
Rikihisa Y, Stills H, Zimmerman G. 1991. Isolation and continuous culture of *Neorickettsia helminthoeca* in a macrophage cell line. J Clin Microbiol, 29 (9):1928-1933.
RKI. 2011. FSME: Risikogebiete in Deutschland. Epidemiologisches Bulletin, 17:133- 148.
Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. 1998. In vitro susceptibilities of 27 *rickettsiae* to 13 antimicrobials. Antimicrob Agents Chemother, 42 (7):1537-1541.
Rolain JM, Stuhl L, Maurin M, Raoult D. 2002. Evaluation of antibiotic susceptibilities of three rickettsial species including *Rickettsia felis* by a quantitative PCR DNA assay. Antimicrob Agents Chemother, 46 (9):2747-2751.
Roulland-Dussoix D, Boyer HW. 1969. The *Escherichia coli* B restriction endonuclease. Biochim Biophys Acta, 195 (1):219-229.
Roux V, Raoult D. 1995. Phylogenetic analysis of the genus Rickettsia by 16S rDNA sequencing. Res Microbiol, 146 (5):385-396.
Roux V, Rydkina E, Eremeeva M, Raoult D. 1997. *Citrate synthase* gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. Int J Syst Bacteriol, 47 (2):252-261.

Rufli T, Mumcuoglu Y. 1981. [*Ixodidae*, hard ticks. *Argasidae,* soft ticks (author's transl)]. Schweiz Rundsch Med Prax, 70 (9):362-385.

Sambrook JF, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1659.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, 74 (12):5463-5467.

Santos AS, Santos-Silva MM, Almeida VC, Bacellar F, Dumler JS. 2004. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in I*xodes* ticks (*Acari: Ixodidae*) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. Emerg Infect Dis, 10 (9):1643-1648.

Sarih M, M'Ghirbi Y, Bouattour A, Gern L, Baranton G, Postic D. 2005. Detection and identification of *Ehrlichia* spp. in ticks collected in Tunisia and Morocco. J Clin Microbiol, 43 (3):1127-1132.

Schultz SM, Nicholson WL, Comer JA, Childs JE, Humphreys JG. 2002. Serologic evidence of infection with g*ranulocytic ehrlichiae* in black bears in Pennsylvania. J Wildl Dis, 38 (1):47-53.

Schwartz I, Varde S, Nadelman RB, Wormser GP, Fish D. 1997. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of Borrelia burgdorferi DNA in blood-fed ticks. Am J Trop Med Hyg, 56 (3):339-342.

Severinsson K, Jaenson TG, Pettersson J, Falk K, Nilsson K. 2010. Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. Parasit Vectors, 3:66.

Sexton DJ, Corey GR, Carpenter C, Kong LQ, Gandhi T, Breitschwerdt E, Hegarty B, Chen SM, Feng HM, Yu XJ, Olano J, Walker DH, Dumler SJ. 1998. Dual infection with *Ehrlichia chaffeensis* and a *spotted fever group rickettsia*: a case report. Emerg Infect Dis, 4 (2):311-316.

Silaghi C, Gilles J, Hohle M, Pradel I, Just FT, Fingerle V, Kuchenhoff H, Pfister K. 2008. Prevalence of *spotted fever group rickettsiae* in *Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae)* in southern Germany. J Med Entomol, 45 (5):948-955.

Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG. 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a *spotted fever group Rickettsia*, from ticks (I*xodes ricinus*) collected in a European city park. Appl Environ Microbiol, 68 (9):4559-4566.

Skarphedinsson S, Sogaard P, Pedersen C. 2001. Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis in high-risk groups in Denmark. Scand J Infect Dis, 33 (3):206-210.

Skarphedinsson S, Jensen PM, Kristiansen K. 2005. Survey of tickborne infections in Denmark. Emerg Infect Dis, 11 (7):1055-1061.

Skarphedinsson S, Lyholm BF, Ljungberg M, Sogaard P, Kolmos HJ, Nielsen LP. 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi,* and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. Apmis, 115 (3):225-230.

Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent,* and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. J Parasitol, 89 (1):194-196.

Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A. 2006. PCR detection of *granulocytic Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. Ann Agric Environ Med, 13 (1):21-23.

Sonenshine. 1991. Biology of ticks. New York: Oxford University Press, Vol. 1.

Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JW. 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry *flea-borne Rickettsia* species. Parasit Vectors, 2 (1):41.

Stanczak J, Gabre RM, Kruminis-Lozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann Agric Environ Med, 11 (1):109-114.

Stanczak J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M. 2009. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. Clin Microbiol Infect, 15 Suppl 2:328-329.

Stenos J, Graves SR, Unsworth NB. 2005. A highly sensitive and specific real-time PCR assay for the detection of spotted fever and typhus group Rickettsiae. Am J Trop Med Hyg, 73 (6):1083-1085.

Strle F. 2004. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. Int J Med Microbiol, 293 Suppl 37:27-35.

Stuen S, Oppegaard AS, Bergstrom K, Moum T. 2005. *Anaplasma phagocytophilum* infection in north Norway. The first laboratory confirmed case. Acta Vet Scand, 46 (3):167-171.

Stuen S, Bergstrom K. 2008. [Human anaplasmosis--a hidden disease in Norway?]. Tidsskr Nor Laegeforen, 128 (22):2579-2581.

Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. 2006. Coinfections acquired from *ixodes ticks*. Clin Microbiol Rev, 19 (4):708-727.

Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. 2009. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii ehrlichiosis.* Expert Rev Anti Infect Ther, 7 (6):709-722.

Tomasiewicz K, Modrzewska R, Buczek A, Stanczak J, Maciukajc J. 2004. The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* infection in Mid-Eastern Poland. Ann Agric Environ Med, 11 (2):261-264.

Tuomi J. 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 2. Differences in virulence of strains in cattle and sheep. Acta Pathol Microbiol Scand, 70 (4):577-589.

Tyzzer EE. 1938. Cytoecetes microti n. gen. n. sp. A parasite developing in granulocytes and infection in small rodents. Parasitology, 30:242- 257.

von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schroppel K, Geissdorfer W, Rollinghoff M, Bogdan C. 2003. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. J Clin Microbiol, 41 (11):5033-5040.

Voytas D. 2001. Agarose gel electrophoresis. Curr Protoc Immunol, Chapter 10:Unit 10 14.

W. S. Gordon AB, D. R. Wilson 1932. Tick borne fever. Comp Pathol Therap, 65:301- 307.

Walder G, Falkensammer B, Aigner J, Tiwald G, Dierich MP, Wurzner R, Lechleitner P. 2003. First documented case of human granulocytic ehrlichiosis in Austria. Wien Klin Wochenschr, 115 (7-8):263-266.

Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, Berek K, Falkensammer B, Huber K, Petrovec M, Dierich MP, Wurzner R. 2006. Human granulocytic anaplasmosis in Austria: epidemiological, clinical, and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. Int J Med Microbiol, 296 Suppl 40:297-301.

Walker DH, Mattern WD. 1980. Rickettsial vasculitis. Am Heart J, 100 (6 Pt 1):896-906.

Weil E, and A. Felix. 1916. Zur serologischen Diagnose des Fleckfiebers. Klin Wochenschreiben, 29:33-35.

Wells GM, Woodward TE, Fiset P, Hornick RB. 1978. Rocky mountain spotted fever caused by blood transfusion. Jama, 239 (26):2763-2765.

Wielinga PR, Gaasenbeek C, Fonville M, de Boer A, de Vries A, Dimmers W, Akkerhuis Op Jagers G, Schouls LM, Borgsteede F, van der Giessen JW. 2006. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia, Anaplasma,* and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. Appl Environ Microbiol, 72 (12):7594-7601.

Wojcik-Fatla A, Szymanska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J. 2009. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi sensu lato, Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. Ann Agric Environ Med, 16 (1):151-158.

Wolbach SB. 1919. Studies on Rocky Mountain spotted fever J Med Res, 41:1- 197.

Woldehiwet Z, Scott GR. 1982. Immunological studies on tick-borne fever in sheep. J Comp Pathol, 92 (3):457-467.

Woldehiwet Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol, 167 (2-4):108-122.
Wolfel R, Terzioglu R, Kiessling J, Wilhelm S, Essbauer S, Pfeffer M, Dobler G. 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. Ann N Y Acad Sci, 1078:509-511.

9. ANHANG

9.1 SPSS- Tabellen

Geschlecht * Rick.Befall Kreuztabelle
Adulte (1) zu Nymphen (3) 2006

			Rick.Befall		
			0	1	Gesamt
Geschlecht	1	Anzahl	228	72	300
		% von Geschlecht	76,0%	24,0%	100,0%
		% von Rick.Befall	56,0%	74,2%	59,5%
	3	Anzahl	179	25	204
		% von Geschlecht	87,7%	12,3%	100,0%
		% von Rick.Befall	44,0%	25,8%	40,5%
Gesamt		Anzahl	407	97	504
		% von Geschlecht	80,8%	19,2%	100,0%
		% von Rick.Befall	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	10,778(b)	1	,001		
Kontinuitätskorrektur(a)	10,035	1	,002		
Likelihood-Quotient	11,276	1	,001		
Exakter Test nach Fisher				,001	,001
Zusammenhang linear-mit-linear	10,756	1	,001		
Anzahl der gültigen Fälle	504				

a Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet
b 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 39,26.

Abb. 9.1.1

Statistische Auswertung mit dem Chi Quadrat- Test zur Prävalenz von *Rickettsia* spp. in adulten Zecken und Nymphen 2006. Adulte *Ixodes ricinus* Zecken sind hochsignifikant häufiger infiziert als Nyphen (p = 0,001).

Geschlecht: 1 = Adulte, 3 = Nymphen

Rick.Befall: 1 = Infektion mit *Rickettsia* spp., 0 = keine Infektion mit *Rickettsia* spp.

Geschlecht * Rick.Befall Kreuztabelle
Adulte (1) zu Nymphen (3) 2007

			Rick.Befall		Gesamt
			0	1	
sGeschlecht	1	Anzahl	235	35	270
		% von Geschlecht	87,0%	13,0%	100,0%
		% von Rick.Befall	52,9%	70,0%	54,7%
	3	Anzahl	209	15	224
		% von Geschlecht	93,3%	6,7%	100,0%
		% von Rick.Befall	47,1%	30,0%	45,3%
Gesamt		Anzahl	444	50	494
		% von Geschlecht	89,9%	10,1%	100,0%
		% von Rick.Befall	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	5,285(b)	1	,022		
Kontinuitätskorrektur(a)	4,619	1	,032		
Likelihood-Quotient	5,462	1	,019		
Exakter Test nach Fisher				,024	,015
Zusammenhang linear-mit-linear	5,274	1	,022		
Anzahl der gültigen Fälle	494				

a Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet
b 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 22,67.

Abb. 9.1.2.

Statistische Auswertung mit dem Chi Quadrat- Test zur Prävalenz von *Rickettsia* spp. in adulten Zecken und Nymphen 2007. Adulte *Ixodes ricinus* Zecken sind hochsignifikant häufiger infiziert als Nyphen (p = 0,024).

Geschlecht: 1 = Adulte, 3 = Nymphen

Rick.Befall: 1 = Infektion mit *Rickettsia* spp., 0 = keine Infektion mit *Rickettsia* spp.

Sammeldatum * Rick.Befall Kreuztabelle
Rickettsien- Infektionsrate 2006 (1) im Vergleich zu 2007 (2)

			Rick.Befall		Gesamt
			0	1	
Sammeldatum	1	Anzahl	407	97	504
		% von Sammeldatum	80,8%	19,2%	100,0%
		% von Rick.Befall	47,8%	66,0%	50,5%
	2	Anzahl	444	50	494
		% von Sammeldatum	89,9%	10,1%	100,0%
		% von Rick.Befall	52,2%	34,0%	49,5%
Gesamt		Anzahl	851	147	998
		% von Sammeldatum	85,3%	14,7%	100,0%
		% von Rick.Befall	100,0%	100,0%	100,0%

Chi-Quadrat-Tests

	Wert	Df	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (2-seitig)	Exakte Signifikanz (1-seitig)
Chi-Quadrat nach Pearson	16,537(b)	1	,000		
Kontinuitätskorrektur(a)	15,819	1	,000		
Likelihood-Quotient	16,803	1	,000		
Exakter Test nach Fisher				,000	,000
Zusammenhang linear-mit-linear	16,521	1	,000		
Anzahl der gültigen Fälle	998				

a Wird nur für eine 2x2-Tabelle berechnet
b 0 Zellen (,0%) haben eine erwartete Häufigkeit kleiner 5. Die minimale erwartete Häufigkeit ist 72,76.

Abb. 9.1.3.

Statistische Auswertung mit dem Chi Quadrat- Test zur Prävalenz von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* Zecken 2006 im Vergleich zu 2007. 2006 waren hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr Zecken mit *Rickettsia* spp. infiziert als 2007.

Sammeldatum: 1 = 2006, 2 = 2007

Rick.Befall: 1 = Infektion mit *Rickettsia* spp., 0 = keine Infektion mit *Rickettsia* spp.

Konfidenzintervalle der *Anaplasma phagocytophilum* Prävalenz:

	Mai 06	Jun 06	Jul 06	Aug 06	Sep 06	Okt 06
Mittelwert	9,3%	9,2%	0	1,1%	19,5%	0
Unteres KI	4,8%	4,7%	0	0,2%	12,6%	0
Oberes KI	17,3%	17,1%	4,3%	5,8%	29,1%	5,7%

	Apr 07	Mai 07	Jun 07	Jul 07	Aug 07	Sep 07
Mittelwert	0	1,2%	2,4%	6,3%	9,5%	3,2%
Unteres KI	0	0,2%	0,7%	2,7%	5,3%	0,9%
Oberes KI	4,6%	6,4%	8,3%	14%	16,6%	11%

Tab. 9.1.1.

Die Tabelle zeigt in Monaten unterteilt die Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* in den 2006 und 2007 untersuchten Zecken mit Angabe des dazugehörigen Konfidenzintervalls.

Apr = April, ,Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September, Okt = Oktober, KI = Konfidenzintervall

Konfidenzintervalle der *Rickettsia* spp. Prävalenz:

	Mai 06	Jun 06	Jul 06	Aug 06	Sep 06	Okt 06
Mittelwert	19,8%	17,2%	20,9%	31,9%	12,6%	9,4%
Unteres KI	12,7%	10,7%	13,7%	23,4%	7,2%	4,4%
Oberes KI	29,4%	26,5%	30,7%	41,9%	21,2%	19%

	Apr 07	Mai 07	Jun 07	Jul 07	Aug 07	Sep 07
Mittelwert	7,5%	14,3%	4.8%	11,4%	15,2%	4,8%
Unteres KI	3,5%	8,4%	1,9%	6,1%	9,6%	1,7%
Oberes KI	15,4%	23,3%	11,6%	20,3%	23,3%	13,3%

Tab. 9.1.2.

Die Tabelle zeigt die Prävalenz von *Rickettsia* spp in *Ixodes ricinus* mit Angabe der dazugehörigen Konfidenzintervalle im Untersuchungszeitraum aufgeteilt nach Monaten.,Jun = Juni, Jul = Juli, Aug = August, Sep = September, Okt = Oktober, Sep = September, KI = Konfidenzintervall

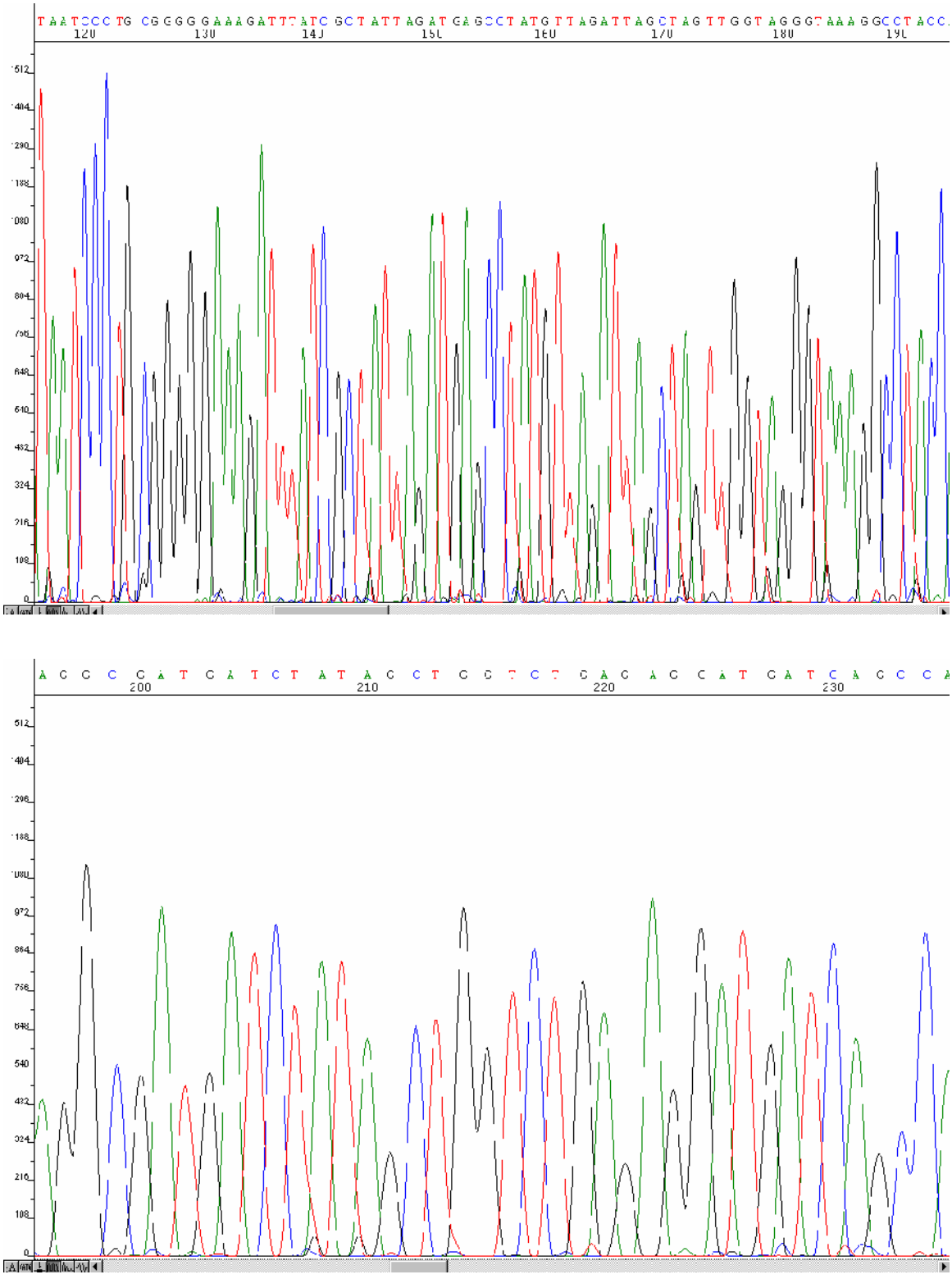


Abb. 9.1.4.

Sequenzierung von *Anaplasma phagocytophilum* mit graphischer Darstellung der Ergebnisse der Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese. Die einzelnen Farben stehen jeweils für eine Pyrimidin- bzw. Purinbase. A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymidin

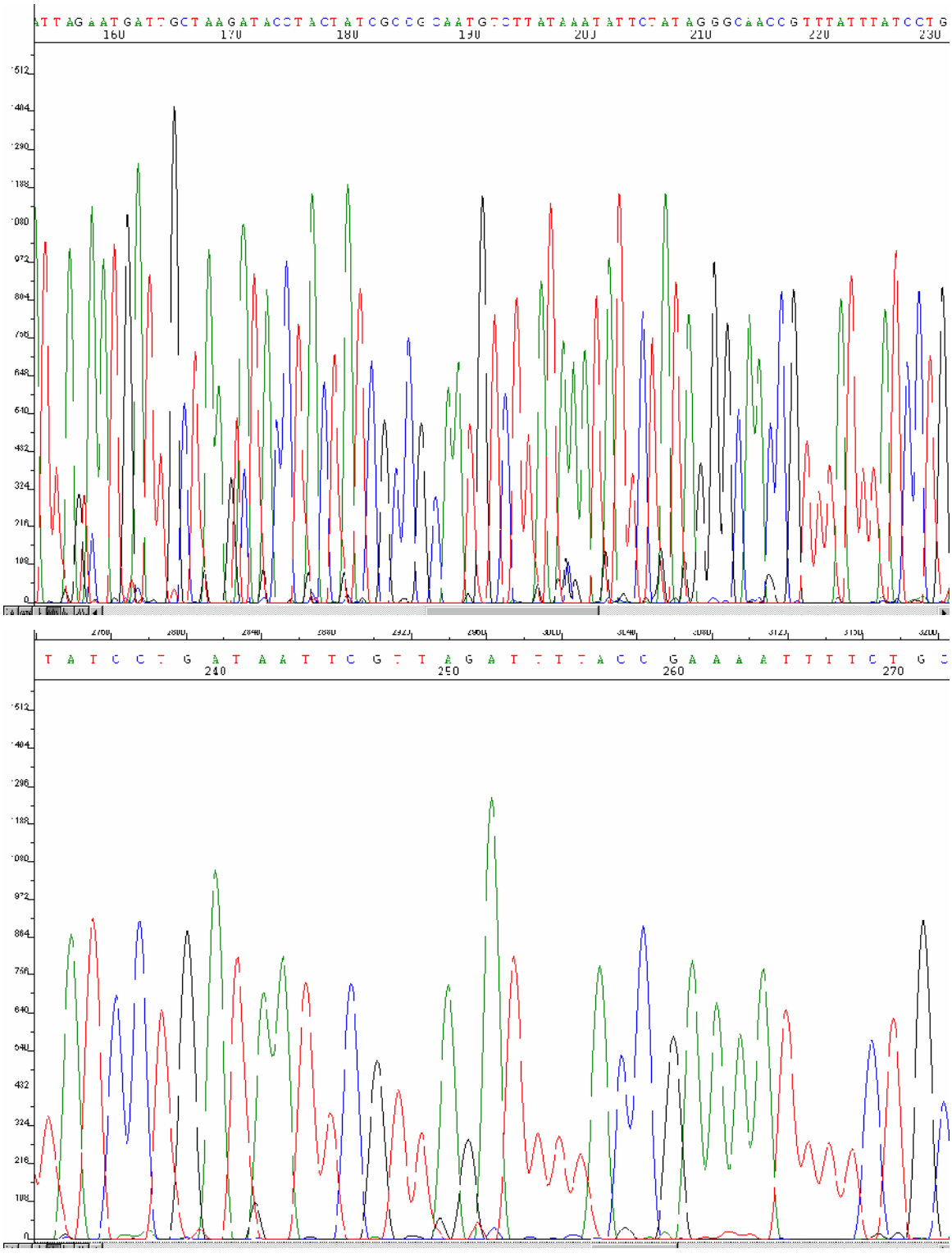


Abb. 9.1.5.

Sequenzierung von *Rickettsia* spp. mit graphischer Darstellung der Ergebnisse der Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese. Die einzelnen Farben stehen jeweils für eine Pyrimidin- bzw. Purinbase. A = Adenosin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymidin

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1. **10**
Der Entwicklungzyklus von *Ixodes ricinus*

Abb. 2.2. **15**
Untergliederung der Symptome einer Infektion mit *Anaplasma* spp. nach Häufigkeiten

Abb. 4.2.1. **36**
Sequenz der 16S DNA von *Anaplasma phagocytophilum*

Abb. 4.3.1 **39**
Sequenz des Citrat Synthase (*gltA*) Gens von *Rickettsia monacensis* IrR/Münchner Stamm

Abb. 5.1. **42**
Durchschnittliche DNA Konzentration der Zecken aufgeteilt nach Entwicklungsstadium

Abb. 5.2. **46**
Amplifikation der Zecken 487 bis 498 mit den Primern AP16 S1v und AP16 S1r

Abb. 5.3.1. **47**
Amplifikation der extrahierten DNA der Zecken 655 bis 666 mit den Primern RH 314 und RH 654

Abb. 5.3.2. **48**
Agarosegel nach Restriktionsverdau der Rickettsien positiven Amplifikate

Abb. 5.3.3. **49**
Darstellung des Anteils von *R. helvetica*, *R. monacensis* und *Rickettsia* spp.

Abb. 5.4.1. **50**
Anzahl der mit *Anaplasma* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2006

Abb. 5.4.2. **51**
Anzahl der mit *Anaplasma* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2007

Abb. 5.4.3. **52**
Anzahl der mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2006

Abb. 5.4.4. **52**
Anzahl der mit *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken 2007

Abb. 5.4.5. **54**
Prävalenz von *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum* und den Koinfektionen

Abb. 5.4.6. **55**
Doppel-, Dreifach- und Vierfachinfektionen

Abb. 5.4.7. **55**
A. phagocytophilum, Babesia spp., *Borrelia* spp*., C. burnetii* und *Rickettsia* spp in Adulten

Abb. 5.4.8. **56**
A. phagocytophilum, Babesia spp*., Borrelia* spp*., C. burnetii* und *Rickettsia* spp. in Nymphen

Abb. 5.4.9. **56**
Koinfektionen mit *Anaplasma* spp.

Abb. 5.4.10. **57**
Koinfektionen mit *Rickettsia* spp.

Abb. 9.1.1 **85**
SPSS Tabelle: Chi Quadrat- Test: Prävalenz von *Rickettsia spp.* 2006

Abb. 9.1.2. **86**
SPSS- Tabelle: Chi Quadrat- Test: Prävalenz von *Rickettsia spp*. 2007

Abb. 9.1.3. **87**
SPSS- Tabelle: Chi Quadrat- Test: Prävalenz von *Rickettsia* spp. 2006 im Vergleich zu 2007

Abb. 9.1.4. **89**
Sequenzierung von *Anaplasma phagocytophilum*

Abb. 9.1.5. **90**
Sequenzierung von *Rickettsia* spp.

9.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1. **8**
In Zecken gefunde Erreger mit humanpathogenen Eigenschaften

Tab. 2.2. **18**
Sensitivität diagnostischer Methoden bezüglich einer Infektion mit *Anaplasma* spp.

Tab. 4.1.1. **27**
Anzahl der gesammelten Zecken 2006

Tab. 4.1.2. **28**
Anzahl der gesammelten Zecken 2007

Tab. 4.2.1. **35**
Primersequenzen nach (Hildebrandt et al. 2002) zum Nachweis von *Anaplasma* spp.

Tab. 4.2.2. **37**
Zielsequenz des Restriktionsenzyms *SspI* und dessen Schnittstelle

Tab. 4.3. **38**
Primersequenzen nach (Nilsson et al. 1999a) zum Nachweis von *Rickettsia* spp.

Tab. 5.1. **45**
Durchschnittliche DNA Konzentration der Zecken

Tab 6.1.1. **59**
Prozentuale Infektionsrate von *Ixodes ricinus* Zecken mit *Anaplasma* spp. in Europa

Tab. 6.1.2. **61**
Serologische Daten einer Infektion mit *Anaplasma* spp. aus europäischen Ländern

Tab 6.1.3. **62**
Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* infizierten *Ixodes ricinus* Zecken

Tab 6.2.1. **63**
Prävalenzen von *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken in Europa

Tab 6.2.2. **64**
Prävalenz von *Rickettsia* spp. infizierten *Ixodes ricinus* Zecken

Tab. 6.2.3. **65**
Serologische Daten einer Infektion mit *Rickettsia* spp.

Tab. 6.3. **67**
Zusammenstellung der Prävalenz von Koinfektionen in *Ixodes ricinus* Zecken in Europa

Tab. 9.1.1. **88**
Prävalenz von *Anaplasma* spp. in *Ixodes ricinus* mit Angabe der dazugehörigen Konfidenzintervalle

Tab. 9.1.2. **88**
Prävalenz von *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* mit Angabe der Konfidenzintervalle

9.4. Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name:	Angela Luise Krämer
Geburtsdatum/ -ort:	06.06.1984 in Lahnstein am Rhein
Eltern:	Ingeborg Josephine und Hans Dieter Krämer
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung

Seit 04/2010:	Assistenzärztin am Universitätsklinikum Jena, IKlinik für Innere Medizin II, Abt. für Hämatologie und Onkologie
2008- 2009:	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Jena
seit 2007:	Beginn der Promotion über die Prävalenz von *Anaplasma* spp. und *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus*
2006- 2009:	Studium der Humanmedizin an der Friedrich Schiller Universität Jena (2. Staatsexamen 09/09 (1,5))
2003- 2006:	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg Universität Mainz (1. Staatsexamen 08/05 (2,5))
seit 2003:	Aufnahme als Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
1995- 2003:	Johannes Gymnasium Lahnstein (Abitur 03/03 (1,1))
1991- 1995:	Goethe- Grundschule Lahnstein

9.5. Publikationen und Kongressbeiträge

Hildebrandt A., Franke J., Schmoock G., Paulicks K., Krämer A., Straube E. 2011. Diversity and Coexistence of Tick- Borne Pathogens in Central Germany. J. Med. Entomol. 45(3): p651- 655.

Hildebrandt A., Krämer A., Sachse S., Straube E. Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). 2010. Ticks Tick- borne Dis. 1: p52- 56.

Hildebrandt A, Franke J., Schmoock G., Pauliks K, Krämer A, Straube E. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Central Germany. XI. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases. 2011 March 24th-26st Poster and oral presentation

Hildebrandt A, Pauliks K, Krämer A, Sachse S, Straube E. Diversity and co-existence of tick-borne pathogens in Middle Germany. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Vienna, Austria, 10 - 13 April 2010. Poster

Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. Detection of *Rickettsia* spp. and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). X. International Jena Symposium on Tick-borne Diseases. 2009 March 19th-21st Poster and oral presentation.

Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E. Detection of *Rickettsia* spp. and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). 61. Tagung der deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) in Göttingen vom 20.09.2009 - 23.09. 2009. Poster

9.6. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Straube, Ordniarus des Institutes für medizinische Mikrobiologie in Jena, für die Überlassung des Themas und die sehr guten Arbeitsbedingungen im Labor. Die tatkräftigen Unterstützung sowohl beim Zeckensammeln als auch beim Publizieren, die zügige Korrektur und den sehr angenehmen Umgang bei den wertvollen Diskussionen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau. Dr. med. Hildebrandt für die unermüdliche Beratung, die Einführung in die Methoden, die positive Kritik, die sehr guten und genauen Anmerkungen und Korrekturen während des Schreibvorgangs und stets netten fachlich kompetenten und überaus rasch erfolgten Antworten auf unzählige Fragen bedanken.

Dankbar bin ich meinen lieben Eltern sowie meinem Bruder Karl, welche durch stetige Ermutigung und Fürsorge zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben.

Ich danke Andreas Schley für die motivierende Unterstützung, das gemeinsame Zeckensammeln, die ans Labor gebrachten Obstsalate mit Kaffee und Einführung in die Geheimnisse von SPSS.

Nicht zuletzt danke ich Ulf Schnetzke für das gewissenhafte Korrekturlesen und der liebevollen Unterstützung bei der Überwindung der Angst vor dem leeren Worddokument.

Meinen Freunden, welche mich immer wieder zur Fertigstellung der Dissertation ermutigt haben.

9.7. Ehrenwörtliche Erklärungen

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

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

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

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

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

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

Jena, 18. Oktober 2011

Angela Luise Krämer