

Untersuchungen viraler, zoonotischer Erreger in Baden-Württemberg

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

**Institut für Zoologie
Fachgebiet Parasitologie**

vorgelegt von
Alexander Lindau

aus Herrenberg
2018

Dekan bzw. Dekanin: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Beifuß

1. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Ute Mackenstedt

2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Johannes Steidle

Eingereicht am: 21.03.2018

Mündliche Prüfung am: 22.11.2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 24.07.2018 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis | i |
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Zecken – Die Vektoren | 1 |
| 1.1.1. Systematik | 1 |
| 1.1.2. Biologie von Ixodidae am Beispiel von <i>I. ricinus</i> | 2 |
| 1.1.2.1. Morphologie der Ixodidae am Beispiel von <i>I. ricinus</i> | 2 |
| 1.1.2.2. Lebensweise der Ixodidae am Beispiel von <i>I. ricinus</i> | 3 |
| 1.1.3. Medizinische Bedeutung | 5 |
| 1.2. Nagetiere – die Wirte | 6 |
| 1.2.1. Systematik | 6 |
| 1.2.2. Biologie | 7 |
| 1.2.2.1. Altweltmäuse (Murinae) | 7 |
| 1.2.2.1.1. Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>) | 8 |
| 1.2.2.1.2. Waldmaus (<i>Apodemus sylvaticus</i>) | 8 |
| 1.2.2.1.3. Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>) | 9 |
| 1.2.2.2. Wühlmäuse (Arvicolinae) | 9 |
| 1.2.2.2.1. Rötelmaus (<i>Myodes glareolus</i>) | 9 |
| 1.1. Das FSME-Virus | 10 |
| 1.1.1. Historisches | 10 |
| 1.1.2. Systematik | 10 |
| 1.1.3. Biologie | 11 |
| 1.1.4. FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis) | 13 |
| 1.1.5. Epidemiologie und Verbreitung | 14 |
| 1.1.6. Situation in Deutschland | 15 |
| 1.4. Das Hanta-Virus | 15 |
| 1.4.1. Historisches | 15 |
| 1.4.2. Systematik | 16 |
| 1.4.3. Biologie | 16 |
| 1.4.4. Infektion beim Menschen | 17 |
| 1.4.5. Epidemiologie und Verbreitung | 19 |
| 1.4.6. Situation in Deutschland | 20 |
| 1.5. Ziel der Arbeit | 22 |
| 2. Material und Methoden | 23 |
| 2.1. Material | 23 |
| 2.1.1. Herkunft der Milchprodukte sowie Standorte des Zecken- und Nagerfangs | 23 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 2.1.2. Zeckenfang (Flaggmethode) | 23 |
| 2.1.3. Nagerfang | 25 |
| 2.1.4. Entnahme der Milchproduktproben | 26 |
| 2.1.5. Serumproben..... | 27 |
| 2.2. Methoden..... | 28 |
| 2.2.1. Probengewinnung | 28 |
| 2.2.1.1. Artbestimmung der geflaggtten Zecken | 28 |
| 2.2.1.2. Homogenisieren der Zecken..... | 28 |
| 2.2.1.3. Probenname bei Milchprodukten | 28 |
| 2.2.1.4. Organentnahme Nagetiere | 28 |
| 2.2.2. Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 2.2.2.1. Nukleinsäureaufreinigung | 29 |
| 2.2.2.1.1. Nukleinsäureaufreinigung der homogenisierten Proben..... | 29 |
| 2.2.2.1.2. Nukleinsäureaufreinigung der Organproben | 30 |
| 2.2.2.2. PCR..... | 30 |
| 2.2.2.2.1. Prinzip der PCR | 30 |
| 2.2.2.2.1.1. Spezialfall Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)..... | 31 |
| 2.2.2.2.2. Prinzip der qualitativen real time-PCR (qrt-PCR) im LightCycler ® | 31 |
| 2.2.2.3. Prinzip der Agarosegelelektrophorese | 32 |
| 2.2.3. Molekularbiologischer Erregernachweis..... | 33 |
| 2.2.3.1. Nachweis von FSME-Viren..... | 33 |
| 2.2.3.2. E-Gen-PCR zur Sequenzierung der FSME-Viren..... | 34 |
| 2.2.3.3. Nachweis von Hanta-Viren | 35 |
| 2.2.3. Prinzip der Zellkultur | 37 |
| 2.2.3.1. Verwendung verschiedener Zelllinien | 37 |
| 2.2.3.2. Anzucht der Zellen aus gefrorenem Material | 37 |
| 2.2.3.3. Splitten der Zellen | 38 |
| 2.2.3.4. Anzucht von FSME Viren | 38 |
| 2.2.3.5. Untersuchung zum Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Viren in verschiedenen Zelllinien | 39 |
| 2.2.3.6. Theorie des Neutralisationstests..... | 40 |
| 2.2.3.6.1 Durchführung des Neutralisationstests..... | 40 |
| 2.2.4. Prinzip der Sequenzierung..... | 41 |
| 2.2.4.1. Prinzip der Amplifikataufreinigung..... | 41 |
| 2.2.4.2. Prinzip des Cycle Sequencing | 42 |
| 2.2.4.3. Aufreinigung der Sequenzierprodukte | 42 |

| | |
|---|----|
| 2.2.4.4. Prinzip der Kapillargelelektrophorese | 42 |
| 2.2.4.5. Sequenzierung der Proben durch die Firma GATC Biotech AG | 43 |
| 2.2.4.6. Datenbankrecherche und phylogenetische Charakterisierung..... | 43 |
| 2.3. Verwendete Materialien und Geräte | 43 |
| 2.3.1. Allgemeines und Zeckenfang..... | 43 |
| 2.3.2. Homogenisieren der Zecken..... | 44 |
| 2.3.3. Nukleinsäureextraktion | 44 |
| 2.3.4. PCR..... | 44 |
| 2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese | 45 |
| 2.3.6. Zellkultur..... | 46 |
| 2.3.7. Geräte..... | 46 |
| 2.3.7. Computerprogramme | 47 |
| 3. Ergebnisse..... | 48 |
| 3.1. Zeckenfang und -bestimmung..... | 48 |
| 3.1.1. Zeckenfang | 48 |
| 3.1.2. Zeckenbestimmung | 49 |
| 3.2. Nagerfang..... | 49 |
| 3.2. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren | 50 |
| 3.2.1. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Zecken..... | 50 |
| 3.2.2. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Organproben von Nagetieren | 51 |
| 3.2.3. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Milchprodukten | 52 |
| 3.3. Molekularbiologisch Charakterisierung und phylogenetische Einordnung der FSME-Viren | 53 |
| 3.3.1. Anzucht von FSME-Viren in der Zellkultur..... | 53 |
| 3.3.2. Amplifikation und Sequenzierung des E-Gens von FSME-Viren zur molekularbiologischen Charakterisierung und phylogenetischen Einordnung..... | 54 |
| 3.3.3. Phylogenetische Einordnung der FSME-Viren..... | 59 |
| 3.3.3.1. Stammbaumerstellung mittels des Maximum Parsimony Verfahrens | 59 |
| 3.3.3.2. Stammbaumerstellung mittels des Maximum-Likelihood Verfahrens | 61 |
| 3.4. Untersuchungen zum Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Virusstämme in unterschiedlichen Zelllinien | 63 |
| 3.4.1. Wachstumsverhalten der Virusstämme in PS-Zellen | 64 |
| 3.4.2. Wachstumsverhalten der Virusstämme in A549-Zellen..... | 64 |
| 3.4.3. Wachstumsverhalten der Virusstämme in Vero B4-Zellen | 64 |
| 3.4.4. Wachstumsverhalten der Virusstämme in MA 23-Zellen | 65 |
| 3.5. Neutralisationstest FSME-Viren | 65 |
| 3.6. Molekularbiologische Erregernachweis von Hantaviren..... | 66 |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| 4. Diskussion..... | 68 |
| 4.1. Zeckenfang..... | 68 |
| 4.2. Nachweis von Pathogenen..... | 69 |
| 4.2.1 Methodik..... | 69 |
| 4.2.1.1 Molekularbiologischer Nachweis von Pathogenen in Zecken..... | 69 |
| 4.2.1.2. Zellkulturelle Untersuchungen..... | 69 |
| 4.2.2. Untersuchungsstandorte..... | 70 |
| 4.2.2.1. Standort Emmendingen..... | 70 |
| 4.2.2.2. Standort Lauterbach..... | 72 |
| 4.2.2.3. Standort Stuttgart Botnang..... | 72 |
| 4.2.2.4. Standort Lorettohof..... | 76 |
| 4.2.2.4.1. Zusätzliche Laborergebnisse der alimentären FSME-Untersuchungen am Standort Lorettohof (Kooperation)..... | 78 |
| 4.2.3. Charakterisierung der FSME-Viren..... | 79 |
| 4.2.3.1. Molekularbiologische Charakterisierung und phylogenetische Einordnung von FSME-Viren..... | 79 |
| 4.2.3.2. Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Virusstämme in verschiedenen Zelllinien..... | 83 |
| 4.2.3.3. Neutralisationstest FSME-Viren..... | 84 |
| 5. Zusammenfassung:..... | 85 |
| 6. Summary:..... | 87 |
| Literaturverzeichnis..... | 89 |
| Abbildungsverzeichnis:..... | 98 |
| Tabellenverzeichnis..... | 100 |
| Probenübersicht..... | 102 |
| Zecken..... | 102 |
| Nagetiere..... | 108 |
| Danksagung..... | 109 |
| Lebenslauf..... | 110 |

1. Einleitung

1.1. Zecken – Die Vektoren

1.1.1. Systematik

Systematisch werden Zecken in den Stamm der Gliedertiere (Arthropoda), die Klasse der Spinnentiere (Arachnida), und die Unterklasse der Milben (Acari) eingeordnet. Innerhalb der Milben bilden sie die Ordnung der Zecken (Ixodida). Bei allen Vertretern der Ixodida handelt es sich um obligat haematophage Tiere. Die Ixodida werden in 3 Familien, die Schildzecken (Ixodidae), die Lederzecken (Argasidae) und Nuttalliellidae unterteilt. Diese Familien unterscheiden sich stark bezüglich ihrer Morphologie und Lebensweise. Namensgebend für die Ixodidae ist das sklerotisierte Rückenschild (Scutum), während sich die Argasidae durch eine weiche lederartige Cuticula auszeichnen. Die Ixodidae stellen mit 692 Spezies in 12 Gattungen die umfangreichste Familie der Zecken dar. Beschrieben sind außerdem 186 Spezies in 6 Gattungen innerhalb der Familie der Argasidae, während innerhalb der Nuttalliellidae nur eine Spezies (*Nuttalliella namaqua*) beschrieben ist (Sonenshine, et al., 2014), (Guglielone, et al., 2010), (Lucius, et al., 2008), (Benoit, et al., 2008). Abbildung 1 zeigt die phylogenetische Einordnung der in dieser Arbeit nachgewiesenen und untersuchten Zeckenarten. Die häufigste Zeckenart in Deutschland ist der gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*)

Inhaltsverzeichnis

Stamm: Arthropoda

Unterstamm: Chelicerata

Klasse: Arachnida

Unterklasse: Acari

Ordnung: Ixodida

Familie: Nutalliellidae

Familie: Argasidae

Familie: Ixodidae

Gattung: *Ixodes*

Art: *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock)

Ixodes acuminatus

Ixodes trianguliceps

Ixodes hexagonus (Igelzecke)

Ixodes frontalis

Gattung: *Dermacentor*

Dermacentor reticulatus (Auwaldzecke)

Abbildung 1: Schematische Darstellung der phylogenetischen Einordnung von Zecken. Es sind nur nachgewiesene Arten aufgeführt. Verändert nach Oliver, 1989 mit Daten von Guglielone, et al., 2010.

1.1.2. Biologie von Ixodidae am Beispiel von *I. ricinus*

Die Biologie der verschiedenen Zeckenfamilien weist große Unterschiede auf. Sowohl in Hinsicht auf innere und äußere Morphologie, als auch in Bezug auf die Lebensweise. Während die meisten Arten der Familie Ixodidae als „Freilandzecken“ bezeichnet werden, leben alle Lederzecken nidicol, also in Höhlen oder Nestern ihrer Wirte. Aufgrund dessen unterscheiden sich die beiden Familien auch hinsichtlich ihres Saugverhaltens. Schildzecken werden zu den Langzeitsaugern gezählt, da sie meistens mehrere Tage lang Blut saugen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei fast allen Argasidae um sogenannte Kurzzeitsauger (15 Minuten bis zu etwa zwei Stunden) (Oliver, 1989) (Sonenshine, et al., 2014).

1.1.2.1. Morphologie der Ixodidae am Beispiel von *I. ricinus*

Der Körperbau der Schildzecken kann in zwei Bereiche geteilt werden. Das Capitulum, der anteriore Teil der Zecke ist mit den Palpen und Mundwerkzeugen ausgestattet. Dabei werden Chelizeren und Hypostom als Mundwerkzeuge zusammengefasst. Diese Mundwerkzeuge dienen dem Saugen von Blut und Lymphe. Hierbei wird die Haut des Wirts mittels der Chelizeren eingeritzt und zu den Seiten hin durch eine reißende Bewegung geöffnet. Anschließend wird das Hypostom, welches dorsal als Rinne ausgebildet und mit posterior gerichteten Zähnen besetzt ist, eingeführt. Zusammen mit den Chelizeren wird so ein Saugrohr gebildet. An der Ansatzstelle dieser Mundwerkzeuge befindet sich dorsal das Tectum (dt. Dach), welches anhand seiner Form zusammen mit anderen Merkmalen als Differenzierungskriterium verschiedener Arten dient. Zusätzlich befindet sich am hinteren Ende des

Capitulums die Basis Capituli, welche die Verbindungsstelle zwischen Capitulum und Körper (Idiosoma) darstellt. Die Basis Capituli besitzt, je nach Art, am hinteren, dorsalen Ende dornartige Auswüchse, die Cornuae. Sehr ähnliche Auswüchse lassen sich lateral auch auf der ventralen Seite finden. Diese werden als Auriculae bezeichnet. Zusätzlich besitzen weibliche Zecken eine, je nach Art, sehr verschieden gestaltige Area Porosa. In diesem Bereich kann das Weibchen einen wachsartigen Stoff sekretieren, mit dem es seine Eier umgibt, um diese vor dem Vertrocknen zu schützen.

Das Idiosoma ist rückseitig bei allen Stadien zumindest teilweise von dem namensgebenden Scutum (Rückenschild) bedeckt, das aus einer sklerotisierten Cutikula besteht. Bei Larven, Nymphen und weiblichen Tieren bedeckt es etwa 1/3 bis 2/3 des Idiosomas, während fast die gesamte Dorsalseite des Männchens sklerotisiert ist. Die geringere Größe des Scutums ermöglicht es sowohl den übrigen Stadien, als auch den weiblichen Tieren größere Mengen Blut aufzunehmen, die sie für die Entwicklung zum nächsten Stadium bzw. zur Bildung und Reifung der Eier (Weibchen) benötigen. Männliche Zecken saugen häufig gar kein Blut oder nur in geringeren Mengen, da sie es nur benötigen um möglichst lange nach einem Weibchen suchen zu können. Je nach Spezies besitzen Zecken verschieden stark ausgeprägte Falten auf der Dorsalseite des Idiosomas. Zusätzlich verfügen einige Zeckenarten über Augen auf der Dorsalseite des Idiosomas. Diese befinden sich, wenn vorhanden, seitlich an der lateralen Falte. Ventralseitig besitzen die Ixodidae, je nach Entwicklungsstadium, sechs (Larve) oder acht (Nymphe & Adultus) Beine. Diese weisen den typischen Aufbau Coxa, Trochanter, Femur, Patella, Tibia, Tarsus, Prätarsus auf. Zusätzlich befindet sich auf der Oberseite des ersten Beinpaars das Haller'sche Organ. Es handelt sich dabei um ein Sinnesorgan, das aus in einer Grube befindlichen Chemorezeptoren besteht, die es der Zecke ermöglichen, verschiedene chemische Verbindungen wie Kohlenstoffdioxid und Ammoniak zu detektieren. Diese Verbindungen werden von Wirtstieren abgegeben und ermöglichen so die Wirtsfindung der Zecke über weite Entfernungen von bis zu 15 Metern. Außerdem können alle Coxen, ähnlich wie das Capitulum, spornartige, nach posterior gerichtete Auswüchse aufweisen, oder zu Syncoxen verschmolzen sein. Auch diese Merkmale können zur Artdifferenzierung herangezogen werden. Des Weiteren finden sich an den Beinen viele borstenartige Haare, die zusammen mit den Spornen wahrscheinlich der Anhaftung am Wirt nach dem Abstreifen dienen. Zusätzlich finden sich auf der Ventralseite verschieden große sklerotisierte Platten, die Analöffnung mit -furche und bei adulten Zecken außerdem eine Genitalöffnung. Dabei erreichen Larven etwa eine Größe von 0,5mm, während Nymphen etwa 1,5mm lang werden. Die weiblichen Tiere sind etwa 1mm größer als ihre männlichen Artgenossen und werden dabei bis zu 4,5mm groß (Lucius, et al., 2008) (Sonenshine, et al., 2014) (Arthur, 1963).

1.1.2.2. Lebensweise der Ixodidae am Beispiel von *I. ricinus*

Die Familie der Schildzecken ist mit Ausnahme der Arktis weltweit verbreitet. Das Verbreitungsgebiet des gemeinen Holzbocks, *I. ricinus*, erstreckt sich vom südlichen Skandinavien bis nach Nordafrika. Außerdem ist *I. ricinus* die häufigste Zeckenart in Deutschland. Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Stadien von *I. ricinus*. Larven werden bis etwa 0,5 mm groß, während Nymphen etwa eine Länge von einem Millimeter besitzen. Die Größe von männlichen Tiere liegt bei zwei Millimetern und die von ungesogenen Weibchen bei etwa drei bis vier Millimetern. Diese können allerdings im gesogenen Zustand über einen Zentimeter groß werden



Abbildung 2: Darstellung von Larve, Nymphe und adulten Exemplaren (Männchen unten, Weibchen oben) von *I. ricinus*.
©: Alexander Lindau

Ixodes ricinus ist eine dreiwirtige Zeckenart. Es bedeutet, dass jedes ihrer drei Stadien an einem anderen Wirt saugt. Befindet sich eine Zecke auf der Suche nach einem Wirt, so klettert sie an der Vegetation nach oben. Dabei erreicht sie, je nach Stadium, Höhen von etwa 1,5 Metern. Die Wirtssuche wird als Questing bezeichnet. Dabei wartet *I. ricinus* mit dem ausgestreckten vorderen Beinpaar auf einen Wirt, um sich von diesem abstreifen zu lassen. Die Wahrnehmung erfolgt dabei hauptsächlich mit Hilfe des Haller'schen Organs, einem Chemorezeptor. Dieses Organ befindet sich auf den Tarsen des ersten Beinpaars und besteht aus einer hinteren Kapsel und einer vorderen Grube. Mit Hilfe des Haller'schen Organs nimmt der Zecke CO_2 , NH_3 , sowie Milchsäure und einige andere Substanzen wahr. Die verschiedenen Höhen während des Questens führen zu einem unterschiedlichen Wirtsspektrum. Larven sind daher am häufigsten auf Nagetieren und Marderartigen und Vögeln zu finden, Nymphen hingegen kommen besonders auf Vögeln (Humair, et al., 1993) (Estrada-Peña, et al., 2005) (meistens Amseln), Eichhörnchen, Igel und Rehen vor; adulten Zecken dienen auch größere Säugetiere wie Wildschweine als Wirt. Außerdem nutzen alle Stadien auch den Menschen als Wirt, da dieser Zecken auf allen Vegetationshöhen abstreifen kann. Zecken bevorzugen für den Stich feuchte, warme Stellen auf dem Wirt mit möglichst weicher Haut (Gelenkinnenseiten, Ohren). Diese wird aufgerissen und das Hypostom eingeführt. Die Palpen werden während des Saugens flach auf die Haut des Wirts gelegt. Sobald die Zecke gestochen hat sekretiert sie Speichel in die Wunde. Dieser Speichel dient verschiedenen Zwecken. Bestandteile des Speichels sind Vasodilatoren und Antikoagulantien, die die Blutgefäße erweitern und die Blutgerinnung verhindern sowie entzündungshemmende Stoffe, da durch eine Entzündungsreaktion die Blutmahlzeit der Zecke zu früh unterbrochen werden kann oder die Zecke am Wirt abstirbt. Aus dem durch das Aufreißen der Haut entstandenen Pool saugt die Zecke nun eine Mischung aus Blut, Lymph- und Zellflüssigkeit. Dabei wird die Kutikula der Zecken, insbesondere der Weibchen so stark gedehnt, dass dieser Vorgang nicht rückgängig gemacht werden kann. Nach der Blutmahlzeit fällt die Zecke von ihrem Wirt ab und zieht sich entweder in die unteren Vegetationsschichten zurück, um sich dort auf die Häutung zum nächsten Stadium vorzubereiten, oder es kommt bei Adulten spätestens hier zur Paarung. Diese erfolgt bei *I. ricinus* oft im Freien kann jedoch auch bereits während des Saugvorgangs des Weibchens stattfinden. Dabei verankert sich das Männchen mit den Mundwerkzeugen in der Geschlechtsöffnung des weiblichen Tiers. Nach der Paarung zieht sich das Weibchen in die Vegetation zurück, um dort eine Ruhepause einzulegen. Während dieser Zeit wird

die Blutmahlzeit verdaut und die Eier (2.000-4.000) reifen heran. Diese Zahl kann allerdings bei anderen Arten mit bis zu 20.000 Eiern deutlich höher sein. Während der Eiablage überzieht das Weibchen diese mit einem wachsartigen Sekret aus der Area Porosa um sie gegen Austrocknung und Pilzbefall zu schützen. Unter besonders guten Umständen kann dieser Lebenszyklus innerhalb eines Jahres abgeschlossen werden, dauert aber im Allgemeinen wenigstens drei Jahre. Allerdings sind auch deutlich längere Zeiten von sechs bis zehn Jahren möglich, da jedes einzelne Stadium auch mehrere Jahre ohne Blutmahlzeit überdauern kann (Sonenshine, et al., 2014) (Oliver, 1989). In Abbildung 3 ist dieser Zyklus für *I. ricinus* dargestellt.

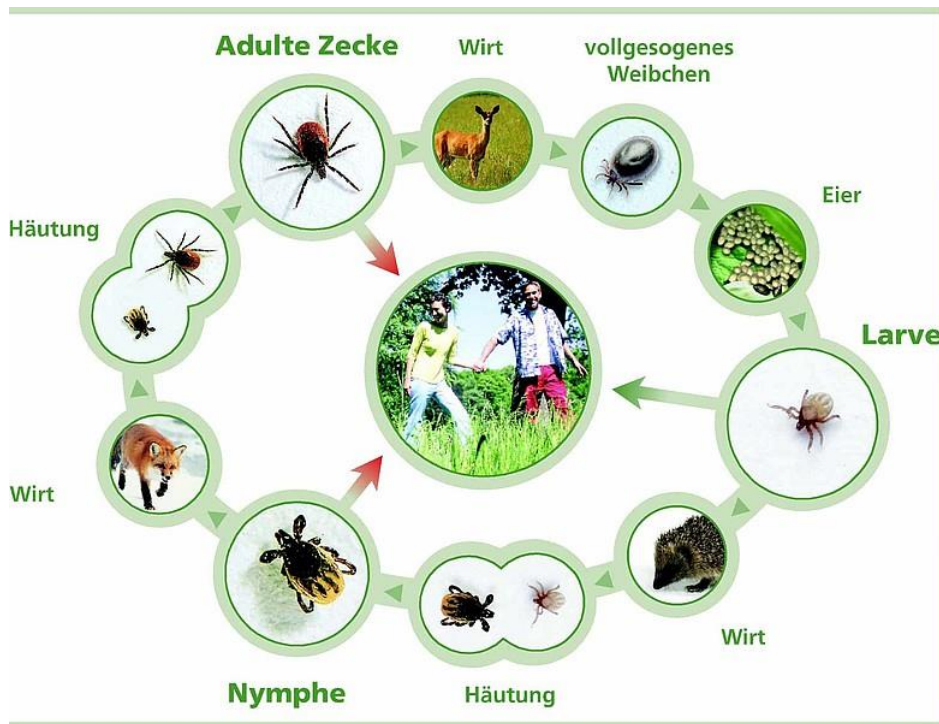


Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *I. ricinus*. Quelle: (Zecken.de) Abfragedatum: 31.03.2017

Da *I. ricinus* eine hohe Luftfeuchtigkeit von mindestens 80% benötigt sowie höhere Temperaturen ab 20°C bevorzugt liegt die Hauptaktivitätszeit dieser Spezies im Zeitraum März bis Oktober, wobei die Aktivität in den heißen und trockenen Sommermonaten Juli und August stark zurückgeht. Allerdings besteht ganzjährig ein Zeckenstichrisiko, da *I. ricinus* bereits ab einer Temperatur von etwa 4 bis 5 °C aktiv ist und Wirte suchen kann (Lindgren, et al., 2000).

1.1.3. Medizinische Bedeutung

Zecken sind von großer medizinischer und veterinärmedizinischer Bedeutung. Sie können unterschiedlichste Schäden verursachen. Diese können in drei verschiedenen Schadensarten unterteilt werden. Die direkten und sekundären Stichschäden, sowie die Auswirkungen, die aus der Übertragung von Krankheitserregern resultieren. Hierbei sind die Stichschäden hauptsächlich im veterinärmedizinischen Bereich von Bedeutung, während die Übertragung von Krankheitsüberträgern sowohl für die Veterinär-, als auch für die Humanmedizin von großer Relevanz ist. Sind Nutztiere von Zecken befallen, so kann dies zu Blutungen, Ödemen, sowie zu Entzündungen und Unruhe der Tiere führen. Dies wiederum resultiert häufig in einer reduzierten Produktivität. Besonders sollte dabei die Zeckenparalyse hervorgehoben werden, die unter anderem durch die in Australien beheimatete, Zecke *Ixodes holocyclus* ausgelöst wird. Während des Stichs überträgt diese Zeckenart zusätzlich Neurotoxine, die zu einer fortschreitenden Lähmung führen und somit tödlich für Menschen und Tiere sein können. Diese Form der Schäden wird als direkter Stichschaden

bezeichnet. Sekundäre Stichschäden entstehen als Folge eines Stiches ohne, dass Krankheiten übertragen werden. So kann sich an der Einstichstelle eine entzündliche Reaktion oder eine Infektion durch in die Wunde gelangte Bakterien entwickeln.

Ihre größte Bedeutung haben Zecken jedoch durch ihre Funktion als Vektoren von Krankheitserregern. Dabei können sowohl Viren, als auch Bakterien und Protisten übertragen werden. Die häufigsten zeckenübertragenen Krankheitserreger sind die Bakterien der Gattung *Borrelia*, besonders die des *Borrelia burgdorferi sensu lato* Komplexes. Hierbei handelt es sich um die Erreger der Lyme-Borreliose. Außerdem werden auch andere wichtige Zoonoseerreger wie FSME, oder Babesien übertragen (Lucius, et al., 2008). Eine Übersicht über die von *I. ricinus* übertragene Erreger findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht über einige von *I. ricinus* übertragene Krankheitserreger (verändert nach Lucius, et al., 2008)

| Erregerart | Pathogen | Krankheit | Wirt |
|------------------|---|-----------------|---------------------------------------|
| Viren | FSME-Virus | FSME | Mensch, Nagetiere, größere Säugetiere |
| | Louping-ill Virus | | Schafe und selten Menschen |
| Bakterien | <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> | Lyme-Borreliose | Mensch, Nager, Hund, Katze, Rind |
| | <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | | Mensch, Rind, Schaf, Hund, Nagetiere |
| | Candidatus <i>Neoehrlichia mikurensis</i> | Neoehrlichiose | |
| Protozoen | <i>Babesia divergens</i> | Babesiose | Rind und selten Mensch |

Pathogene werden allerdings nicht nur über (Reservoir-) Wirte, sondern auch innerhalb der Zeckenpopulation weitergegeben. Dabei sind zwei Vorgänge von Bedeutung. Das Pathogen kann von den adulten Tieren auf die Eier, bzw. vom Männchen zuerst auf das Weibchen, übertragen werden. Dieser Vorgang wird als transovarielle Übertragung bezeichnet. Außerdem bleiben einige Krankheitserreger in mehreren Zeckenstadien erhalten. Dies wird als transstadiale Übertragung bezeichnet. Besonders im Hinblick auf Viren ist außerdem eine Weitergabe der Pathogene innerhalb der Zeckenpopulation ohne infizierten Wirt möglich. Dies kann auftreten, wenn mindestens zwei Zecken, von denen eine infiziert ist, sehr nah bei einander Blut saugen und die Viren so direkt von einer Zecke auf die Andere übertragen werden, ohne dass der Wirt eine virämische Phase aufweist. Besonders wichtig ist dieser Vorgang für das FSME-Virus, allerdings wurde das Co-feeding auch für *Borrelia burgdorferi* und das Louping-ill-Virus gezeigt. (Randolph et al., 1996).

1.2. Nagetiere – die Wirte

1.2.1. Systematik

Rodentia (Nagetiere) sind die Ordnung innerhalb der Säugetiere mit dem bei weitem größten Artenreichtum. Etwa 42% aller Säugetierearten sind Nagetiere (Wilson, et al., 2005). Vertreter dieser Ordnung sind weltweit mit Ausnahme der Antarktis verbreitet und weisen sehr mannigfaltige Verhaltensweisen und Morphologien auf. Abbildung 4 zeigt die systematische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Arten.

Klasse: Säugetiere (Mammalia)

Unterklasse: Höhere Säugetiere (Eutheria)

Rang: Nagetiere (Rodentia)

Familie: Langschwanzmäuse Muridae

Unterfamilie: Altweltmäuse (Murinae)

Gattung: Waldmäuse (*Apodemus*)

Art: Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*)

Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*)

Gattung: Ratten (*Rattus*)

Wanderratte (*Rattus norvegicus*)

Familie: Wühler (Cricetidae)

Unterfamilie: Wühlmäuse (Arvicolinae)

Gattung: Rötelmäuse (*Myodes*)

Art: Rötelmaus (*Myodes glareolus*)

Abbildung 4: Systematische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Nagetiere (Dieterlen, 2005 (a))

1.2.2. Biologie

Das auffälligste Merkmal der Nagetiere sind ihre Nagezähne, die sich im Laufe der Evolution aus den Schneidezähnen entwickelt haben und ein Leben lang wachsen. Es sind pro Kiefer zwei Nagezähne vorhanden, die aus dem vorderen meielförmigen Zahnschmelz und dem dahinterliegenden, weicheren Zahnbein bestehen. Durch diesen Aufbau schleifen sich die vorderen Teile der Zähne beim Nagen gegenseitig ab, während das Zahnbein durch die aufgenommene Nahrung abgerieben wird. Dadurch bleibt die typische Form der Nagezähne erhalten. Zusätzlich sind die Nagezähne sehr tief im Kiefer verankert. Der Platz ist vorhanden, da Nagetiere weder über Eck-, noch über vordere Backenzähne verfügen.

Die Nagezähne sind die einzige Gemeinsamkeit, die nahezu jedes Nagetier aufweist. Diese unglaublich erfolgreiche Ordnung von Tieren hat nahezu jeden Lebensraum, der Säugetieren zur Verfügung steht, besiedelt. Es gibt terrestrische, Wasser assoziierte und unterirdisch lebende Arten. Obwohl sich die meisten Nagetiere hauptsächlich von pflanzliche Nahrung ernähren gibt es auch Arten, die Fische oder Insekten fressen. Auch die Körpergröße ist sehr variabel und schwankt zwischen etwa fünf Zentimetern und 1,3 Metern. Ebenfalls unterscheiden sie sich in Hinsicht auf die Aktivitätszeiten, der Fortpflanzung und anderen Dingen (Dieterlen, 2005 (a)).

1.2.2.1. Altweltmäuse (Murinae)

Altweltmäuse besitzen eine meistens schlanke Körperform mit kurzem Fell. Sie sind eher klein, wobei es auch tropische Arten gibt, die bis zu 50 cm groß werden. Sie besitzen einen langen Schwanz und

große Ohren. Die Murinae sind ursprünglich sowohl in Europa, Asien, Australien als auch in Afrika beheimatet. Allerdings wurden sowohl die Hausmaus, als auch die Haus- und die Wanderratte durch den Menschen weltweit verbreitet (Dieterlen, 2005 (a)).

1.2.2.1.1. Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*)

Gelbhalsmäuse besitzen eine leicht spitze Schnauze, große Ohren und Augen und einen Schwanz, der die Kopf-Rumpf Länge übersteigt. Namensgebend ist der in verschiedenen Ausprägungen vorhandene gelbliche Kehlfleck, oder auch Brustfleck, -streifen. Das Verbreitungsgebiet von *A. flavicollis* erstreckt sich vom Süden Norwegens bis ins südöstliche Frankreich. Die Gelbhalsmaus ist in ganz Baden-Württemberg zu finden und bewohnt hauptsächlich Wälder und Waldränder. Dabei bevorzugt sie besonders Gebiete mit dichter Laubstreu. Insgesamt bewegen sich Gelbhalsmäuse normalerweise in einem Gebiet mit einer Größe zwischen von 230m² bis zu 22000m². Der Durchschnitt liegt bei etwa 3700m² abhängig von Alter und Geschlecht der Individuen. Jedoch können männliche Tiere zu Fortpflanzungszwecken auch deutlich größere Bereiche von bis zu 55000m² durchqueren (Turni, 2005 a). Abbildung 5 zeigt eine Gelbhalsmaus im Sprung.



Abbildung 5: *Apodemus* spp. im Sprung. Quelle: (Robiller, 2011) Abfrage: 31.03.2017. Anmerkung: Vom Urheber als Gelbhalsmaus bezeichnet. Autor: F.C. Robiller

1.2.2.1.2. Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*)

Die Waldmaus sieht der Gelbhalsmaus sehr ähnlich. Unterscheiden lassen sich die beiden Arten anhand verschiedener Faktoren. So sind Waldmäuse im Allgemeinen etwas kleiner, ihr Kehlfleck, falls vorhanden, ist niemals als Band oder Streifen ausgeprägt. Außerdem ist ihr Schwanz meistens kürzer als die Kopf-Rumpf Länge. Die farbliche Abgrenzung des Rücken-, und Bauchfells ist weniger klar als bei *A. flavicollis*. Die Waldmaus ist mit Ausnahme des nördlichen Skandinaviens in ganz Europa sowie in Afrika und großen Teilen Asiens verbreitet. In Baden-Württemberg ist sie wie *A. flavicollis* ubiquitär zu finden. Gegensätzlich zu ihrem Namen kommt die Waldmaus häufiger auf freien Flächen als im Wald vor. Sie bevorzugt mit Hecken bewachsene Bereiche, sowie die Ufer von Seen und Teichen. Außerdem ist sie auch in anthropogen stark beeinflussten Bereich wie Hausgärten regelmäßig anzutreffen (Turni, 2005 b).

1.2.2.1.3. Wanderratte (*Rattus norvegicus*)

Wanderratten gehören zu den am wenigsten spezialisierten Nagetierarten überhaupt. Sie können nicht nur ausgezeichnet laufen und klettern, sondern auch sehr gut schwimmen und stellt so geringe Ansprüche an ihren Lebensraum, da sie selbst in der Kanalisation leben kann. Obwohl die Wanderratte Reviere besitzt, die sie auch verteidigt, ist sie nicht daran gebunden und ein Wechsel stellt für sie kein Problem dar. *R. norvegicus* kommt sowohl solitär, als auch in kleinen Familienverbänden oder großen Rudeln von 50 und mehr Tieren vor. Die durchschnittliche Kopf-Rumpf Länge liegt bei 21 cm, wobei der Schwanz nur etwa 18 cm lang wird. Im Gegensatz zur Hausratte (*Rattus rattus*) hat die Wanderratte eine gedrungene Gestalt. Die Wanderratte ist in ganz Europa und durch den Menschen auch auf allen anderen Kontinenten außer der Antarktis verbreitet. Auch wenn *R. norvegicus* unterirdische Lebensräume bevorzugt so ist sie doch keineswegs daran gebunden und kann auch in Scheunen und auf Müllkippen gefunden werden (Dieterlen, 2005 (b)). Abbildung 6 zeigt eine Wanderratte entlang eines Wasserlaufs. Deutlich ist die bräunliche Fellfarbe, die walzenartige Körperform, sowie die im Gegensatz zur Hausmaus kleineren Ohren und Augen zu erkennen.



Abbildung 6: Wanderratte an einem Flusslauf. Deutlich zu erkennen sind die Augen und Ohren die beide kleiner sind als bei der Hausratte. Quelle: (Hellwig, 2009) Datum des Abrufs: 31.03.2017. Autor: Hans-Jörg Hellwig

1.2.2.2. Wühlmäuse (Arvicolinae)

Die Arvicolinae sind gut an ihre hauptsächlich unterirdische Lebensweise angepasst. Sie besitzen verhältnismäßig kleine Augen und Ohren, eine stumpfe Schnauze und einen gedrungenen Körper. Der Schwanz aller Wühlmäuse ist kürzer als die Kopf-Rumpf Länge. Da sie sich nicht springend fortbewegen sind ihre Hinterfüße im Gegensatz zu den Altweltmäusen nicht verlängert. Sie sind hauptsächlich auf offenen Wiesenflächen, oder auch Waldlichtungen zu finden (Dieterlen, 2005 (a)).

1.2.2.2.1. Rötelmaus (*Myodes glareolus*)

Ihre Körperform entspricht der typischen Gestalt von Wühlmäusen, wobei sie allerdings relativ große Augen und Ohren besitzt. Namensgebend ist die rötliche Färbung des Rückenfalls. An den Seiten ist ihr Fell braun und geht gen Bauchseite in ein Grau bis Weiß über. *M. glareolus* ist in Europa weit verbreitet. Sie kann überall von Südwestfrankreich über Teile Italiens bis ins nördliche Skandinavien nachgewiesen werden. In Baden-Württemberg ist die Rötelmaus ebenfalls ubiquitär vorhanden. Dabei bevorzugt sie Lebensräume, die ihr ausreichend Deckung bieten in Form von Sträuchern und Bäumen. Da sie nicht nur hervorragend graben, sondern auch gut klettern können, findet man sie

auch häufig an Waldrändern und in Wäldern. *M. glareolus* bewohnt kleinere Habitate als sowohl *A. flavicollis* als auch *A. sylvaticus* (Burkhardt, et al., 2005).

1.1. Das FSME-Virus

1.1.1. Historisches

Die Erstbeschreibung der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) datiert auf das Jahr 1931 und geht auf den österreichischen Mediziner Schneider zurück. Er erkannte das saisonale Muster einer bestimmten Form der aseptischen Meningoenzephalitis. In den darauffolgenden Jahren wurden Beschreibungen aus Sibirien, dem Fernen Osten und der ehemaligen Tschechoslowakei veröffentlicht. Im Jahr 1937 gelang es dem russischen Mediziner Lev Zilber das Virus zu isolieren. Er war es auch, der entdeckte, dass das Virus durch *Ixodes persulcatus* auf den Menschen übertragen wurde. Zwei Jahre später beschrieb Pavlovsky die FSME als Zoonose, indem er den Zyklus zwischen Säugetier und Zecke aufklärte. Mittlerweile konnte das FSME-Virus in beinahe allen Ländern Europas, sowie in Russland und im Fernen Osten nachgewiesen werden (Aspöck, 2010) (Gritsun, et al., 2003).

1.1.2. Systematik

Das FSME-Virus gehört zu den Arboviren (arthropod borne virus), zur Familie *Flaviviridae* und darin zur Gattung *Flavivirus*. Zu dieser Familie zählen außerdem die Gattungen *Pestivirus* (Erreger der Schweinepest), sowie *Hepacivirus* (u.a. Hepatitis C-Virus). Die Gattung *Flavivirus* kann anhand des übertragenden Vektors unterteilt werden. Dabei unterscheidet man die Viren, die durch Zecken übertragen werden von den durch Stechmücken übertragenen Viren. Bei einer dritten Gruppe innerhalb der Flaviviren sind die Überträger noch nicht bekannt. Während Zecken beispielsweise das FSME-Virus, das Louping-ill-Virus, sowie das Langat-Virus übertragen, handelt es sich bei den Stechmücken übertragenen Flaviviren um die Erreger des Gelbfieber-Virus (Virusprototyp dieser Familie), oder den Erreger des Dengue-Fiebers. Die dritte Gruppe von Viren ist nur von geringer Bedeutung, da sie keine humanmedizinische Relevanz besitzt.

Die FSME-Viren können weiterführend in drei Subtypen unterteilt werden. Sie unterscheiden sich deutlich anhand ihrer verursachten Krankheitsbilder, sowie ihrer geographischen Verbreitung. Diese Subtypen lassen sich anhand ihrer Sequenzen weiter unterscheiden und in Stämme unterteilen (Gritsun, et al., 2003) (Aspöck, 2010) (Lindquist, et al., 2008).

1. Der europäische Subtyp wird primär durch *I. ricinus* übertragen und ist in Zentral-, Nord-, und Osteuropa, sowie im westlichen Teil Russlands verbreitet. Er ruft die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), auch „tick-borne encephalitis“ (TBE) oder auch „Central European Encephalitis“ genannte Erkrankung hervor. Dabei handelt es sich um die Infektion mit der mildesten Verlaufsform. Ihre Letalität liegt bei etwa 1-2%. Als Prototyp wird der Stamm Neudoerfl genutzt, der auch Grundlage eines entwickelten Impfstoffs gegen FSME ist.
2. Als Vektor für den sibirischen Subtyp dient *Ixodes persulcatus*. Er hat sein Hauptverbreitungsgebiet in Sibirien, es wurden aber auch schon Stämme im Norden Finnlands und im Nordwesten Russlands identifiziert. Die verursachte Erkrankung wird als „Russian-Spring-Summer-Encephalitis“ (RSSE) bezeichnet. Die Letalität dieses Subtyps liegt bei etwa 5%. Als Prototyp gilt hierbei der Stamm Vasilchenko.
3. Die Übertragung des fernöstlichen Subtyps erfolgt ebenfalls durch *Ixodes persulcatus*. Er ist in Russland, sowie in Teilen Japans und Chinas verbreitet. Diese ebenfalls als RSSE bezeichnete Krankheit zeigt häufig sehr schwere Verlaufsformen und Letalitätsraten

zwischen 15 und 20%. In seltenen Fällen kommt es außerdem zu chronischen Infektionen, in denen auch nach zehn Jahren noch Erregermaterial nachweisbar ist.

Abbildung 7 zeigt die systematische Einteilung einer Auswahl von Arboviren.

Arbovirus

| | |
|---------|------------------------------|
| Familie | Flaviviridae |
| Gattung | <i>Pestivirus</i> |
| | <i>Hepacivirus</i> |
| | <i>Flavivirus</i> |
| | durch Stechmücken übertragen |
| | Gelbfieber-Virus |
| | Dengue-Virus |
| | durch Zecken übertragen: |
| | Louping ill-Virus |
| | Langat-Virus |
| | FSME-Virus |
| | Europäischer Subtyp |
| | Sibirischer Subtyp |
| | Fernöstlicher Subtyp |

Abbildung 7: Systematische Positionierung des FSME-Virus innerhalb der Arboviren

1.1.3. Biologie

Das FSME-Virus besitzt eine ikosaedrische, behüllte Form mit einer Größe von etwa 50nm. Es handelt sich bei dem Virus um ein einzelsträngiges RNA-Virus mit positiver Organisationsrichtung. Dadurch wirkt das Virusgenom selbst als direkt infektiöse mRNA. Es besitzt einen offenen Leserahmen und kodiert für ein 3414 aa langes Polyprotein. Dieses Polyprotein wird sowohl co- als auch posttranslational durch virale und wirtseigene Proteasen gespalten. Dabei entstehen drei Strukturproteine und 7 Nichtstrukturproteine (Leyssen, et al., 2000) (Abbildung 8).

| | | | | | | | | | | | |
|-------|--------------------|------|---|-----------------------|------|------|-----|------|------|-----|-------|
| 5'UTR | Offener Leserahmen | | | | | | | | | | 3'UTR |
| Cap | C | preM | E | NS1 | NS2A | NS2B | NS3 | NS4A | NS4B | NS5 | |
| | Strukturproteine | | | Nichtstrukturproteine | | | | | | | |

Abbildung 8:: Schematischer Aufbau des FSME-Genoms: C: Kapsidprotein, preM: Vorläufer Membranprotein, E: Hüllprotein, NS: Nicht-Strukturprotein, Cap: Cap-Struktur, UTR: nicht kodierender Bereich (Verändert nach Leyssen, et al., 2000)

Bei den Strukturproteinen handelt es sich um die Proteine C, preM und E. Das C-Protein (Kapsid-Protein) bildet zusammen mit der viralen RNA die kugelförmige Nukleokapsidstruktur des Virus mit einem Durchmesser von 30nm. Zusammen mit dem Membranprotein (M-Protein) und dem Hüllprotein (E-Protein), die sich als Oberflächenproteine in eine Lipiddoppelschicht einlagern bildet das C-Protein das Kapsid. Die Nichtstrukturproteine besitzen verschiedene Funktionen. Sie wirken als Proteasen (NS2A & NS2B), Helikasen (NS3) oder als RNA-abhängige Polymerasen (NS4A, NS4B, NS5) (Leyssen, et al., 2000).

Die Infektion des Wirtsorganismus beginnt mit der Invasion der Wirtszelle. Dabei bindet das E-Protein an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle und induziert so die Endocytose. Das Virus wird in einem Endosom in die Zelle aufgenommen. Dort herrscht ein niedriger pH-Wert, der zu einer Konformationsänderung des E-Proteins führt. So kann es die Fusion der Virushülle mit der Membran des Endosoms induzieren. Das Viruskapsid wird in der Zelle freigesetzt. Im Zytoplasma kommt es zum „uncoating“, der Freisetzung des Genoms aus dem Kapsid. Der 5'-nicht kodierende Bereich leitet die RNA nun zu den Ribosomen, wo die Translation des offenen Leserahmens zu einem Vorläuferpolyprotein erfolgt. Anschließend wird das Polyprotein durch Proteasen in seine funktionsfähigen Bestandteile gespalten. Die im Virus enthaltene RNA-abhängige RNA-Polymerase produziert nun einzelsträngige RNA mit negativer Polarität, welche als Vorlage für neue Virusgenome dienen. Das Assembly, also der Zusammenbau, der neuen Genome und Proteine erfolgt anschließend im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die dabei entstehenden Viren sind noch unreif, besitzen also noch eine Vorläuferform des eigentlichen Membranproteins. Dies verhindert, dass die Viren beim Ausschleusen wieder mit den Transportvesikeln verschmelzen können, was eine Infektion anderer Zellen verhindern würde. Die Ausschleusung erfolgt über den sekretorischen Weg der Wirtszelle, also über den Golgi-Apparat. Der niedrige pH-Wert innerhalb der Vesikel führt zur Umwandlung des PreM- zum M-Protein. Die reifen Viren werden ausgeschleust. Abbildung 9 zeigt diese Vorgänge (Lindquist, et al., 2008), (Mansfield, et al., 2009), (Stiasny, et al., 2006).

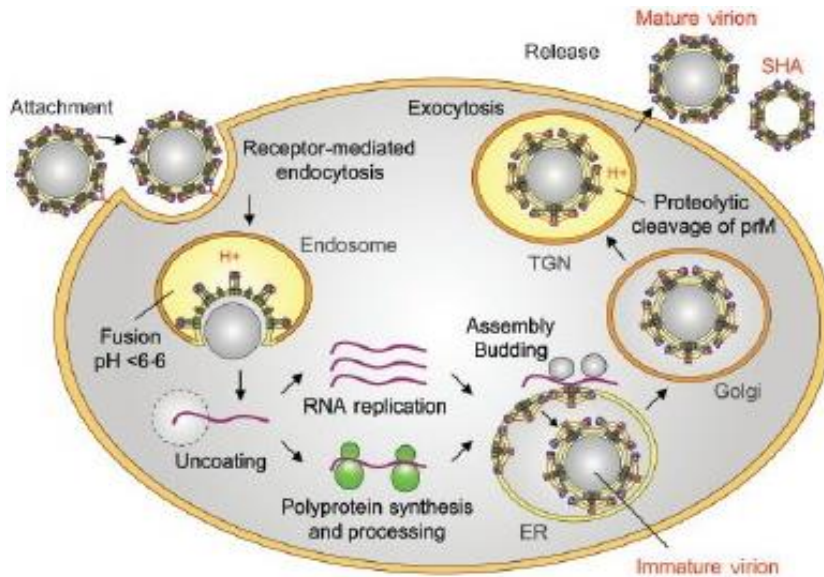


Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Replikation der FSME-Viren. ER: endoplasmatisches Retikulum, TGN Trans-Golgi-Netzwerk (Stiasny, et al., 2006)

1.1.4. FSME (Frühsommer-Meningoenzephalitis)

Die Hauptquelle für Infektionen stellt die direkte Übertragung während eines Zeckenstichs dar. Die Viren sind in den Speicheldrüsen der Zecken lokalisiert, sodass sie bereits wenige Minuten nach dem Stich übertragen werden können. Einen alternativen Infektionsweg stellt der Konsum unpasteurisierter Milch infizierter Tiere dar. Besonders in den Ländern Osteuropas und in Russland ist diese Form der Übertragung von Bedeutung (Balogh, et al., 2010), (Caini, et al., 2012) (Kohl, et al., 1996). Allerdings sind auch Fälle von alimentärer FSME aus Österreich und Deutschland bekannt (Holzmann, et al., 2009), (Brockmann, et al., in press).

Es ist davon auszugehen, dass ein Drittel aller Infizierten Symptome entwickelt, während die Erkrankung in den übrigen Fällen unbemerkt verläuft. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 28 Tagen (häufiger 7 bis 14 Tage) treten allgemeine Symptome einer viralen Infektion wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen auf. Nach etwa 2 bis 5 Tagen bessert sich die Symptomatik deutlich oder heilt gar ganz aus. Falls die Krankheit nach dieser ersten unspezifischen Phase nicht ausheilt kommt es nach 4 bis 8 Tagen zur für die FSME typischen zweiten Phase. Hierbei treten nun typische Symptome einer Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) auf. Dies geschieht bei etwa 30% aller Personen, bei denen die Erkrankung nicht subklinisch verläuft (Kaiser, 1999). Dabei handelt es sich bei etwa 60% der Fälle um eine Meningitis, in etwa 30% der Fälle um eine Meningoenzephalitis und in etwa 10% der Fälle kommt es zu einer Meningoenzephalomyelitis. Die Letalität des europäischen Subtyps liegt bei etwa 2%. Die Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert direkt mit dem Alter der Patienten. Je älter der Patient, desto wahrscheinlicher nimmt die FSME einen schweren, klinischen Verlauf. So ist beispielsweise bei einem 60 Jahre alten Patienten in etwa der Hälfte aller Fälle mit einer Meningoenzephalitis zu rechnen und etwa 25% entwickeln eine Meningoenzephalomyelitis (Kaiser, 2008)

Diagnostisch ist es zwar möglich eine Infektion mit FSME-Viren während der virämischen Phase mittels PCR aus dem Blut des Patienten nachzuweisen, jedoch finden hauptsächlich serologische Verfahren Verwendung. Wichtig ist dabei zu beachten, dass Antikörper gegen FSME-Viren sehr häufig Kreuzreaktionen mit anderen Viren aus der Gattung der Flaviviren zeigen (Mansfield, et al., 2009)

Es gibt bisher keine antiviralen Medikamente, die eine ursächliche Therapie der FSME ermöglichen würden. Es bleibt daher nur die Möglichkeit prophylaktische Maßnahmen zu ergreifen. Dabei ist die

sicherste Prophylaxe die Dreifach-Impfung. Sie bietet einen zuverlässigen Schutz für 3 bis 5 Jahre (Dumpis, et al., 1999). Zusätzlich bietet es sich an eine Expositionsprophylaxe vorzunehmen. Dies bedeutet, wenn möglich Risikogebiete zu meiden, sowie Repellentien gegen Zecken zu verwenden.

1.1.5. Epidemiologie und Verbreitung

FSME-Viren zirkulieren zwischen Zecken (Vektor) und Säugetier. Je nach Entwicklungsstadium dienen verschieden große Säugetiere als Wirte. Obwohl der Vektor fast flächendeckend zu finden ist, kommen FSME-Viren nur in sehr kleinen Naturherden vor (Kimmig, et al., 2001 (a)). Die Prävalenz von FSME-Viren in Zecken in so einem Mikrofokus beträgt zwischen 0,5% (Larven) und 5% (Adulte) kann jedoch im Zentrum deutlich höher liegen (Dobler, et al., 2011).

Jedes Stadium der Zecke kann als Vektor für das FSME-Virus dienen, dabei kann die Virusaufnahme nicht nur auf den beiden beschriebenen Wegen geschehen, sondern auch transovarial (geringe Bedeutung), transstadial (wobei es sich dabei eigentlich um eine Persistenz handelt), als auch sexuell.

Obwohl die Zecken das FSME-Virus durch das Saugen von Blut von einem virämischen Wirt aufnehmen können, spielt diese Form der Infektion von Zecken eher eine untergeordnete Rolle, da die klassischen Wirte, wie kleine Nagetiere nur eine äußerst kurze virämische Phase aufweisen. Deutlich wichtiger ist dabei das Co-feeding (Randolph, et al., 1996). Hierbei erfolgt die Übertragung der Viren direkt von einer Zecke zur anderen, wenn die in sehr geringer Entfernung zueinander auf dem Wirt saugen.

Neben den Kleinnagern, wie zum Beispiel der Wald-, oder Feldmaus können auch andere Wildtiere wie Igel, Hasen, oder Füchse von Bedeutung für die Aufrechterhaltung des Zyklus in der Natur sein. Größere Säugetiere wie Wildschweine, oder Rehe, sowie Vögel scheinen dabei eher eine geringe Rolle zu spielen, sind aber von großer Bedeutung für die Verbreitung des Virus in der Natur.

Das Verbreitungsgebiet des FSME-Virus erstreckt sich von Mittel- und Osteuropa über große Teile Russlands bis nach China und Teile Japans. Dabei kommen die unterschiedlichen Subtypen entsprechend ihrer Vektoren in unterschiedlichen Gebieten vor (Lindquist, et al., 2008)(Siehe Abbildung 10).



Abbildung 10: Verbreitungsgebiete der Vektorzecken. Blau: *I. ricinus*, Lila: *I. persulcatus*, Grün: Beide Arten parallel. Gestrichelte Linie: Verbreitungsgebiet der FSME (Lindquist, et al., 2008)

1.1.6. Situation in Deutschland

Seit dem Jahr 2001 müssen FSME-Erkrankungen an das Robert Koch-Institut gemeldet werden. Seit dem wurden deutschlandweit 4990 Fälle gemeldet, die der Referenzdefinition des RKI entsprechen (RKI, 2017). Im Durchschnitt lag die Anzahl der jährlichen Fälle bei 312, wobei die Jahre 2005, 2006, 2011 und 2013 besonders herausstechen (jeweils mehr als 400 Fälle). Besonders stark betroffen sind die Bundesländer Baden-Württemberg und Bayern, aus denen 4258 der gemeldeten Fälle (je 2134 bzw. 2124 Fälle) stammen. Auch Hessen mit 301 Fällen ist stark betroffen. Bemerkenswert ist außerdem, dass im Jahr 2016 11 humane Fälle von FSME aus Niedersachsen gemeldet wurden; einem Bundesland aus dem bisher nie mehr als 6 Meldungen kamen. Aus den anderen Bundesländern gibt es nur Meldungen weniger, vereinzelter Fälle (RKI, 2017). Abbildung 11 zeigt diese Verteilung.

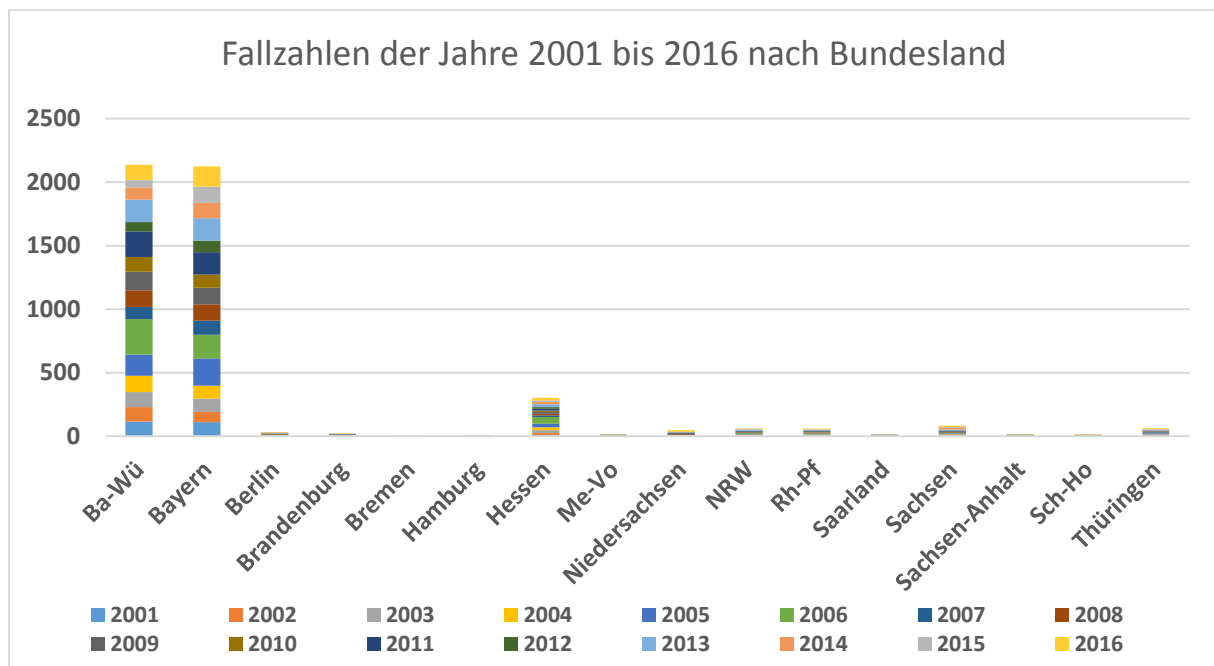


Abbildung 11: Anzahl gemeldeter Fälle von FSME nach Bundesland und Jahr (Quelle: RKI, 2017)

1.4. Das Hanta-Virus

1.4.1. Historisches

Die Bezeichnung des Virus als Hanta-Virus leitet sich von dem Namen des Flusses Hantan in Südkorea ab. Während des Koreakrieges (1950-53) erkrankten mehr als 3000 Soldaten der UN Truppen an einer Krankheit die sich durch starke Nierenschädigung (bis zum Nierenversagen), hohem Fieber und Hämorrhagien äußerte. Zu dieser Zeit wurde die Krankheit als „Koreanisches, hämorrhagisches Fieber“ bezeichnet. Erst im Jahr 1978 gelang es einer Gruppe um den südkoreanischen Virologen Ho Wang Lee das Virus im Lungengewebe von Ratten aus der Nähe des Flusses Hantan nachzuweisen (Lee, et al., 1982). Allerdings gibt es bereits aus früheren Zeiten Aufzeichnungen über Erkrankungsfälle, die wahrscheinlich auf Infektionen mit Hantaviren zurückzuführen sind. So existieren chinesische Schriften aus dem 12. Jahrhundert, in denen von einer Nierenerkrankung die Rede ist und auch die in England und später im kontinentalen Europa ab dem Jahre 1485 aufgetretene „sweating sickness“ geht vermutlich auf Hantaviren zurück. Dies wurde allerdings erst in neuerer Zeit erkannt, als festgestellt wurde, dass zumindest das Andes-Virus, welches ebenfalls zu den Hanta-Viren gehört, auch zwischen Menschen übertragen werden kann (Taviner, et al., 1998), (Martinez, et al., 2005).

1.4.2. Systematik

Hantaviren gehören zur Familie Bunyaviridae und bilden innerhalb dieser die Gattung *Hantavirus*. Außerdem gehören zu dieser Familie noch die Gattungen *Orthobunyavirus* (Bataivirus), *Nairovirus* (Hämorrhagisches Krim-Kongo-Fieber Virus), *Phlebovirus* (Rifttalfiebervirus), sowie eine Gattung von Pflanzenviren (*Tospovirus*). Abbildung 12 zeigt die systematische Einordnung der Hantaviren, sowie eine Auswahl verschiedener Vertreter.

| | |
|---------|--|
| Familie | Bunyaviridae |
| | Gattung <i>Orthobunyaviridae</i> |
| | Bataivirus |
| | <i>Nairovirus</i> |
| | Hämorrhagisches Krim-Kongo-Fieber Virus |
| | <i>Phlebovirus</i> |
| | Rifttalfiebervirus |
| | <i>Tospovirus</i> |
| | Hanta-Virus |
| | Hantaan Virus |
| | Puumala Virus |
| | Dobrava-Belgrad Virus |

Abbildung 12: Systematische Positionierung der Hantaviren innerhalb der Familie der Bunyaviridae.

1.4.3. Biologie

Hantaviren sind einzelsträngige RNA-Viren mit negativer Orientierung. Morphologisch erscheinen sie abgerundet oder oval und besitzen eine Größe von ca. 80-160nm (Martin, et al., 1985). Die RNA besteht dabei aus 3 Teilen. Einem kleinen Segment (S-Segment), einem mittleren Segment (M-Segment) und einem großen Segment (L-Segment). Dabei besitzt jedes Segment einen ORF (open reading frame, offenen Leserahmen), welcher durch nicht-kodierende Bereiche flankiert wird. Das S-Segment kodiert dabei für das Nukleokapsid, das M-Segment für ein Vorläufer-Glykoprotein, das zu den beiden Glykoproteinen Gn und Gc reift, während das L-Segment die RNA-abhängige RNA-Polymerase kodiert. Abbildung 13 zeigt den Aufbau eines Viruspartikels schematisch.

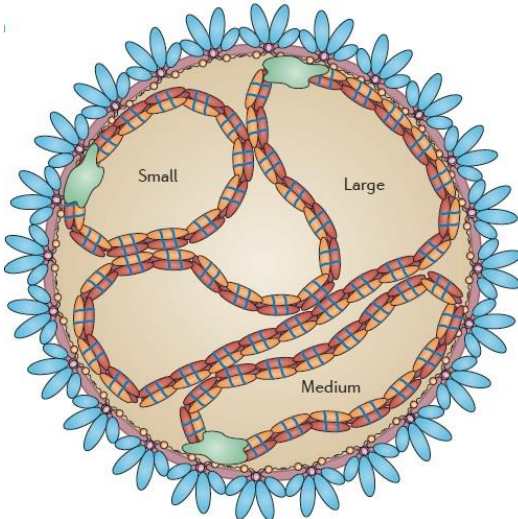


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Hantaviruspartikels. Dargestellt ist die segmentierte RNA, sowie das Nukleokapsid, die RNA-abhängige RNA-Polymerase und die Glykoprotein-Hülle. Nach Vaheiri, et al., 2013

Um die Wirtszellen zu infizieren, binden die Viruspartikel an Rezeptoren der Zelloberfläche, wodurch eine Konformationsänderung und somit die Endocytose ausgelöst wird. Der Viruspartikel wird in einem Endosom in die Zelle aufgenommen. Durch ein Absinken des pH-Werts reift dieses Endosom und die Virusmembran verschmilzt mit der Membran des Endosoms. Die Virusvermehrung erfolgt dann wahrscheinlich in einem Kompartiment zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (ERGIC, ER-Golgi intermediat compartment), jedoch ist dieser Schritt noch nicht abschließend aufgeklärt. Unreife Viruspartikel werden in Transportvesikeln vom Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert, wo sie durch Fusion der Membranen ausgeschleust werden (Vaheiri, et al., 2013). Abbildung 14 zeigt diese Vorgänge schematisch.

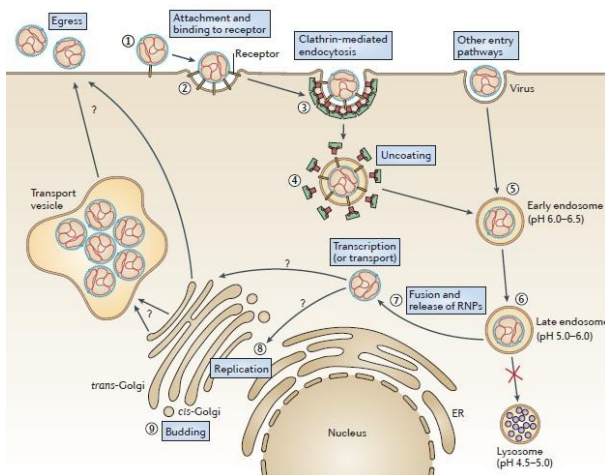


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Vorgänge vor, während und nach der Vermehrung von Hantaviren in Wirtszellen. Nach Vaheiri et al., 2013.

1.4.4. Infektion beim Menschen

Während eine Infektion mit Hantaviren bei den Reservoirwirten (Nagetiere) keine Symptome verursacht, kann sie beim Menschen zu schweren Erkrankungen und sogar zum Tode führen. Die Hauptinfektionsquelle für Menschen besteht im Einatmen von virushaltigen Aerosolen aus Nagerkot und -urin infizierter Wirte. Allerdings ist in seltenen Fällen auch eine Infektion durch den Biss eines

Tiers möglich. Zusätzlich ist auch eine Infektion von Mensch zu Mensch zumindest für das Andes-Virus nachgewiesen (Martinez, et al., 2005).

Die Viren werden nach den verursachten Symptomen in verschiedene Kategorien eingeteilt. Hierbei wird zwischen Viren, die ein hämorrhagisches Fieber mit renalen Syndrom (HFRS) auslösen und solchen, die ein kardiopulmonales Syndrom (HCPS) verursachen, unterschieden. Bei beiden Formen der Krankheit geht die Pathogenität nicht von der virusverursachten Zellzerstörung, sondern von immunologischen Prozessen aus.

Liegt eine HFRS-Virusinfektion vor, so erhöht sich die Durchlässigkeit der Blutgefäße durch deren Schädigung, was zu einem Absinken des Blutdrucks führt, wobei die stärksten Auswirkungen im Bereich der Nieren auftreten. Diese Form der Erkrankung wird besonders durch die Virusarten Dobrava-Belgrad, Hantaan, Seoul, sowie Puumala verursacht. Diese sind in Europa und Asien verbreitet. Nach einer Inkubationszeit von ein bis zwei Wochen, in seltenen Fällen von bis zu acht Wochen, setzen die Symptome meist sehr plötzlich ein. Dabei handelt es sich um starke Kopf-, Rücken- und Bauchschmerzen, sowie hohes Fieber, Übelkeit und Sehstörungen. Der Verlauf der Infektion ist stark von der Virusart abhängig und verläuft bei Hantaan und Dobrava-Belgrad meist deutlich schwerer als bei Seoul und Puumala. Der Krankheitsverlauf wird dabei in fünf Phasen unterteilt. In der ersten Phase, der Fieberphase, treten allgemeine, unspezifische grippeähnliche Symptome wie hohes Fieber, Kopf-, und Gliederschmerzen auf. Nach etwa drei bis sieben Tagen kommt es zur hypotonischen Phase. Dabei kann es außerdem, während einer Dauer von bis zu zwei Tagen, zu Hämorrhagien durch Blutplättchenmangel, Übelkeit und Erbrechen kommen. Ein dadurch eintretender Schockzustand kann unbehandelt zum Tode führen. Anschließend kommt es zu einer Phase reduzierter Urinbildung. Diese entsteht durch die fortschreitende Schädigung der Nieren, die bis zum vollständigen Nierenversagen führt und drei Tage bis eine Woche lang andauern kann. In der nächsten Phase produziert der Körper eine stark erhöhte Menge an Urin (bis zu sechs Litern pro Tag). Diese diuretische Phase dauert mehrere Wochen lang an. Eine Erholung kann mehrere Monate dauern, wobei die Schädigung der Nieren auch permanent sein kann (Lee, et al., 1989), (Vapalahti, et al., 2003), (Lednicky, 2003), (Krüger, 2009). Die Letalität einer Infektion mit HFRS-Viren liegt je nach Virusart zwischen 2% und 10%. Einen Sonderfall der HFRS-Variante stellt die Infektion mit dem auch in Süddeutschland verbreiteten Puumala-Virus dar. Diese als Nephropathia epidemica bezeichnete Variante verläuft deutlich milder als die übrigen HFRS-Infektionen. Nur in seltenen Fällen treten dabei Hämorrhagien auf und auch die Anzahl der subklinisch verlaufenden Fälle ist deutlich höher. Die Letalität einer Puumala-Infektion liegt bei weniger als 1 % (Lednicky, 2003) (Vapalahti, et al., 2003).

Im Falle einer Infektion von HCPS-Hantaviren liegen die Schwerpunkte in der Lunge und dem Herzen. Trotzdem gibt es je nach auslösender Virusart auch Beteiligungen der Nieren. Die beiden häufigsten Virenarten sind das Sin-Nombre Virus und das Andes Virus, die in Nord-, bzw. in Südamerika vorkommen. Der Verlauf einer HCPS ist deutlich schwerer als einer HFRS. Dies zeigt sich auch in der Letalitätsrate der Infektion, die bis zu 40% betragen kann. Nach einer Inkubationszeit von etwa zwei bis drei Wochen treten auch hier die ersten Symptome auf. Dabei handelt es sich um unspezifische, grippeähnliche Symptome wie hohes Fieber, Übelkeit und Kopfschmerzen. Im weiteren Verlauf, sobald auch Herz und Lunge beteiligt sind, kommen außerdem eine erhöhte Herzfrequenz, eine beschleunigte Atmung, Blutplättchenmangel und ein trockener Husten dazu. Der Tod tritt durch Herzversagen oder ein Lungenödem ein. Bei einer Infektion mit anderen Virusarten, wie beispielsweise dem Black-Creek Virus kommt es auch zur Beteiligung anderer Organe, sodass die Symptomatik nicht mehr so eindeutig ist (Lednicky, 2003).

Die diagnostischen Methoden sind in Abhängigkeit vom Stadium der Krankheit zu wählen. Da ein molekularbiologischer Nachweis der Erreger nur in den ersten Tagen der klinisch ausgeprägten Infektion möglich ist (kurze virämische Phase) erfolgt der Nachweis einer Hantavirusinfektion hauptsächlich auf serologischem Wege. Dabei kommen sowohl Immunofluoreszenztests (IFTs), als auch Enzym-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) zum Einsatz. Hierbei gelingt der Nachweis von IgM Antikörpern meist bereits sehr früh, während IgG Antikörper erst etwas später nachweisbar sind. Eine genaue Spezifizierung des Virus ist auf diese Weise nur schwer möglich und erfordert die Verwendung verschiedener Virusantigene (Vapalahti, et al., 2003) (Lednicky, 2003) (Kimmig, et al., 2001 (b)).

Eine Vorbeugung ist nur möglich, indem der Kontakt mit Nagetieren bzw. deren Kot und Urin, sowie infizierten Personen vermieden wird. Ist dies nicht möglich sollte bei der Arbeit und dem Umgang mit Gefahrenquellen ein Mundschutz, sowie Handschuhe getragen. Obwohl bereits seit den 1990ern an einem Impfstoff geforscht wird gibt es keinen kommerziell erhältlichen gegen Hantaviren.

Des Weiteren ist es nicht möglich eine Infektion mit Hantaviren gezielt antiviral zu behandeln. Lediglich die Symptome der Erkrankung lassen sich unterstützend behandeln.

1.4.5. Epidemiologie und Verbreitung

Jährlich werden weltweit etwa 150.000 bis 200.000 Infektionen mit Hantaviren gemeldet. Dabei entfallen nur etwa 200 Fälle auf HCPS-Infektionen in Amerika, während etwa 70% bis 90% der Fälle in China auftreten (Bi, et al., 2008). Hantaviren sind sowohl in Asien, als auch in Europa, sowie Nord-, Mittel-, und Südamerika und Afrika verbreitet. Da Hantaviren stark an ihren spezifischen Reservoirwirt angepasst sind ist ihr Verbreitungsgebiet von der Verbreitung des Wirts abhängig (Lednicky, 2003). Tabelle 2 zeigt eine Auswahl verschiedener Virusarten, sowie deren Reservoirwirte und die verursachte Erkrankung.

Inhaltsverzeichnis

Tabelle 2: Verbreitung, Reservoirwirte und hervorgerufene Erkrankung verschiedener Hantavirusarten. Verändert nach (Krüger, et al., 2013) ergänzt mit Daten von (Klempa, et al., 2012) und (Schmaljohn, et al., 1997). HFRS: Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom, NE: Nephropathia epidemica, HCPS: Hantavirus-assoziiertes kardiopulmonales Syndrom, n.b.: nicht bestimmt

| Virusart | | Wirtsart | Wirtsart lat. | Erkrankung | Verbreitung |
|------------------------|----------------|--------------------------|--|------------|------------------------|
| <i>Puumala</i> | | Rötelmaus | <i>Myodes glareolus</i> | HFRS (NE) | Europa |
| <i>Dobrava-Belgrad</i> | <i>Kurkino</i> | Brandmaus | <i>Apodemus agrarius</i> | HFRS | Zentral- & Osteuropa |
| | <i>Dobrava</i> | Gelbhalsmaus | <i>Apodemus flavicollis</i> | HFRS | Balkan |
| | <i>Sochi</i> | Kaukasus-Waldmaus | <i>Apodemus ponticus</i> | HFRS | Russland |
| <i>Tula</i> | | Feldmaus | <i>Microtus arvalis</i> | HFRS | Europa |
| <i>Hantaan</i> | | Brandmaus | <i>Apodemus agrarius</i> | HFRS | China, Korea, Russland |
| <i>Seoul</i> | | Wanderratte Hausratte | <i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus rattus</i> | HFRS | weltweit |
| <i>Andes</i> | | Zwergreisratte | <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | HCPS | Südamerika |
| <i>Sin Nombre</i> | | Hirschmaus | <i>Peromyscus maniculatus</i> | HCPS | Nordamerika |
| <i>El Moro Canyon</i> | | Westliche Erntemaus | <i>Reithrodontomys megalotis</i> | n.b. | Mittelamerika |

1.4.6. Situation in Deutschland

Seit 2001 sind Infektionen mit Hantaviren in Deutschland laut §6 des Infektionsschutzgesetzes namentlich zu melden. Seit diesem Zeitpunkt wurden in Deutschland bis Ende 2016 10.415 Fälle gemeldet. Die meisten gemeldeten Fälle stammen dabei aus Baden-Württemberg (5413), wobei auch die Bundesländer Bayern, Niedersachsen und Nordrhein-Westfalen stark betroffen sind. Abbildung 15 zeigt die Anzahl gemeldeter Hantavirusinfektionen nach Bundesland und Jahr.

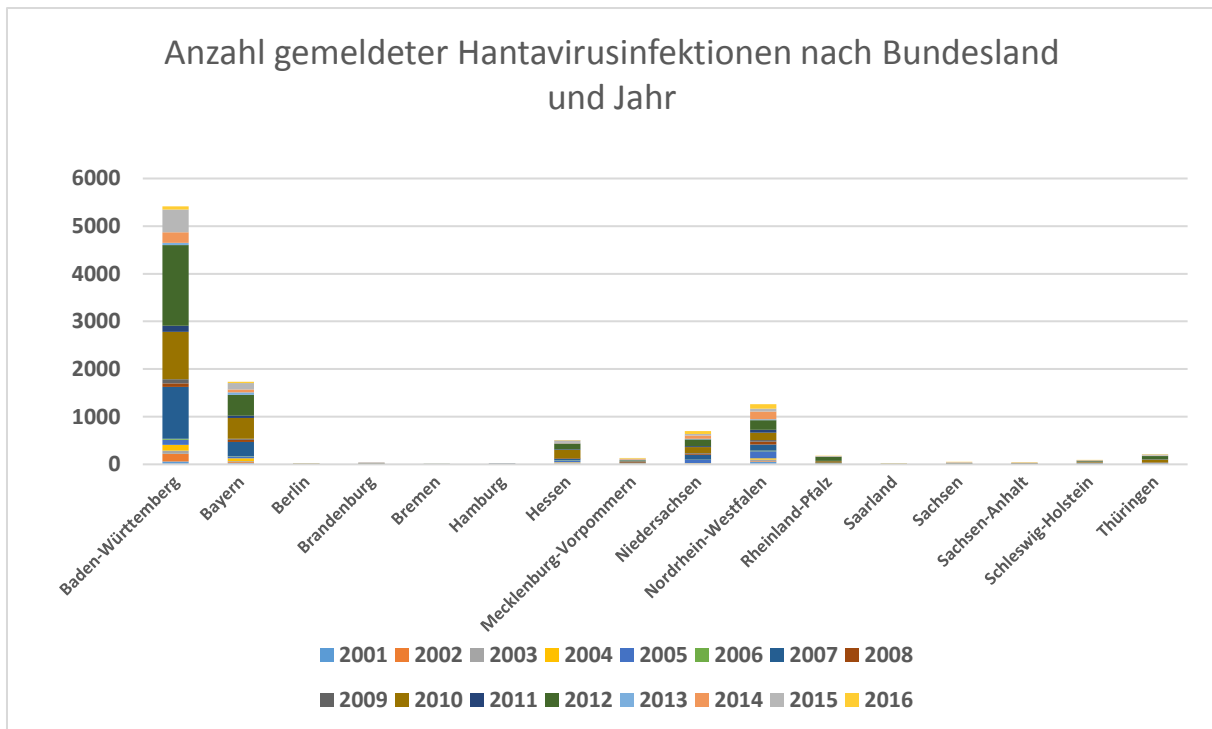


Abbildung 15: Anzahl gemeldeter Hantavirusinfektionen nach Bundesland und Jahr. Quelle: Robert Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0, <https://survstat.rki.de>, Abfragedatum: 14.03.2017

Besonders auffallend sind dabei die hohen Zahlen an Infektionen in den Jahren 2007, 2010 und 2012, die mit mehr als 3500 deutlich über der ansonsten gemeldeten Anzahl von etwa 2500 Fällen pro Jahr liegen. In Baden-Württemberg sind besonders der Stadtkreis Stuttgart und der Landkreise Reutlingen betroffen (RKI, 2017). Es ist jedoch anzunehmen, dass die tatsächliche Anzahl an Infektionen in Deutschland deutlich höher liegt, da Erkrankungen hauptsächlich auf die Virusart Puumala zurückzuführen sind, die meist nur einen milden Krankheitsverlauf zur Folge hat und häufig nicht diagnostiziert wird (Krüger, 2009). Die starken Schwankungen der Infektionen geht wahrscheinlich auf die verschiedenen hohe Anzahl an Reservoirwirten zurück. Dabei führt eine höhere Reservoirwirtdichte zu einer erhöhten Infektionsrate zwischen den Tieren und einer erhöhten Menge an infektiösem Material in der Umwelt. Die Wirtdichte wird dabei durch verschiedene Faktoren, wie Härte des vorangegangenen Winters, dem Nahrungsangebot und regelmäßigen Vermehrungszyklen bedingt (Krüger, et al., 2013).

1.5. Ziel der Arbeit

Durch Vektoren übertragene Infektionskrankheiten sind von großer Relevanz in der Humanmedizin. Dabei stellen Zecken die wichtigsten Vektoren in Deutschland dar und übertragen u.a. das Frühsommer Meningoenzephalitis Virus (FSME-Virus). Das FSME-Virus wird dabei hauptsächlich durch die Zeckenart *Ixodes ricinus*, den gemeinen Holzbock, übertragen, kann allerdings auch alimentär mit der Nahrung aufgenommen werden. Da FSME-Viren nur sehr kleinräumige in sogenannten FSME-Naturherden in Reservoirwirten und Vektoren verbreitet sind sollen Zecken an verschiedenen Standorten in Baden-Württemberg mit der Flagg-Methode gesammelt und auf FSME-Viren untersucht werden.

Bei den Standorten handelte es sich um einen Privatgarten in Stuttgart Botnang der bereits seit 1988 als FSME-positiv bekannt ist, einen Standort im Landkreis Emmendingen, an dem bereits früher FSME-Viren in Zecken nachgewiesen wurden und ein möglicher FSME-Fokus, der anhand eines humanen Falls nahe Lauterbach identifiziert werden sollte. Darüber hinaus sollte das Gebiet um den Ziegenhof „Lorettohof“ auf FSME-Viren in Zecken, sowie in Rohmilchprodukten des Hofes untersucht werden, nachdem sich dort zwei humane Fälle von alimentärer FSME ereignet hatten.

Um möglichst detaillierte Informationen über die verschiedenen FSME-Naturherde zu erlangen sollen diese charakterisiert werden. Des Weiteren soll die alimentäre Übertragung von FSME-Viren anhand eines Ausbruchs am Standort Lorettohof untersucht werden. Zusätzlich wird die Prävalenz von Hanta-Viren am Standort Stuttgart Botnang untersucht, sowie Neutralisationstests und Wachstumsversuche in Zellkultur mit FSME-Viren durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Herkunft der Milchprodukte sowie Standorte des Zecken- und Nagerfangs

Es wurden Zecken an 4 verschiedenen Standorten gesammelt. Tabelle 1 zeigt die GPS-Koordinaten der Standorte. Diese wurden mittels www.maps.google.de ermittelt.

Tabelle 3: GPS-Koordinaten der untersuchten Standorte. *: Zeckenfang, +: Nagerfang, §: Milchprodukte, ¹ persönliche Mitteilung: Oehme

| Standortname | Landkreis | Nord | West | Kriterium |
|--------------------------------------|-------------|-----------|----------|-----------------------------------|
| Emmendingen Neumattengraben (EN)* | Emmendingen | 48.113946 | 7.827140 | Bekannter Standort (Lindau, 2013) |
| Lauterbach (Lb)* | Rottweil | 48.223324 | 8.378556 | Patientengespäch ¹ |
| Lorettohof (Lh)*,§ | Reutlingen | 48.249839 | 9.461026 | FSME in Ziegenkäse |
| Stuttgart Botnang (SB)*+ | Stuttgart | 48.787183 | 9.131188 | Bekannter Standort |

2.1.2. Zeckenfang (Flaggmethode)

Sämtliche in dieser Arbeit untersuchte Zecken wurden mittels der Flaggmethode gesammelt. Dabei wird ein Moltontuch, welches an einem „Holz-T“ befestigt ist (Abbildung 16), eine sogenannte Zeckenfahne, verwendet.

Im Habitat der Zecken wurde die Fahne über die Vegetation und den Boden gezogen und alle 10 Meter auf Zecken untersucht. Alle gefundenen Zecken wurden mit einer Pinzette abgesammelt und in 50ml-Zellkulturröhrchen überführt. Zusätzlich wurde ein Grashalm oder ein Blatt in das Röhrchen gegeben, um die Luftfeuchtigkeit zu regulieren und die Zecken so bis zur Lagerung am Leben zu halten. Nach dem Flaggen wurden die Röhrchen bei -80°C im Landesgesundheitsamt Stuttgart gelagert.



Abbildung 16: Aufbau einer Zeckenfahne. Eine Zeckenfahne besteht aus einem Rundholz (Griff), einem 1m langen Kantholz (Verbindung) und einem 1m x 1m großen Moltontuch (Fahne).

Inhaltsverzeichnis

Das Sammeln der Zecken erfolgte im Zeitraum vom 01.04.2014 bis zum 31.10.2016 in Emmendingen, vom 02.04.2014 bis zum 31.10.2015 am Standort Lauterbach, vom 29.06.2016 bis 22.07.2016 am Standort Lorettohof und vom 10.03.2015 bis 31.10.2016 am Standort Stuttgart Botnang.



Abbildung 17: Standort Emmendingen mit geflaggter Strecke. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017

Abbildung 17 zeigt die geflaggte Strecke am Standort Emmendingen zu Beginn der Arbeit

Um die genaue Lage des FSME-Mikrofokus bestimmen zu können wurde das Gebiet in Bereiche unterteilt, die in den folgenden Jahren verkleinert wurden. Abbildung 17 und Abbildung 18 zeigen die Einteilung des Gebiets in Fangbereiche für die Jahre 2014 bis 2016. Dabei wurden im Jahr 2014 alle vier Bereiche, im Jahr 2015 die Bereiche B und C untersucht.



Abbildung 18: Aufteilung des Flaggebiets Emmendingen 2014 (A+B+C+D) und 2015 (B+C). Quelle: (Google), Abfrage: 31.03.2017

Im Jahr 2016 wurde eine neue Unterteilung des Grenzgebiets von B und C vorgenommen (Abbildung 19), das in drei Gebiete unterteilt wurde. Dabei stellen natürliche Hindernisse die Grenzlinien zwischen den Gebieten dar. Die Bereiche a und b sind durch einen Bachlauf getrennt, während der Teil c durch einen breiten Schotterweg von a und b abgegrenzt wird.



Abbildung 19: Aufteilung des Fanggebiets Emmendingen 2016. Quelle (Google), Abfrage 31.03.2017

Abbildung 20 zeigt den Standort Lauterbach und die dort geflaggte Strecke.



Abbildung 20: Geflaggte Strecke am Standort Lauterbach. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017 aus (Lindau, 2013)

Abbildung 21 zeigt den Standort Lorettohof und die dort geflaggtten Bereiche (rot). Dabei handelt es sich um Bereiche entlang landwirtschaftlicher Nutzflächen, Wiesen, sowie Waldrändern und einen Waldweg.



Abbildung 21: Geflaggte Bereiche am Standort Lorettohof. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017

2.1.3. Nagerfang

Die Nagetiere wurden alle am Standort Stuttgart Botnang von den Grundstückseigentümern im Rahmen einer Schädlingsbekämpfung mittels Totschlagfallen gefangen. Diese wurden im Zeitraum

01.02.2015 bis 30.11.2016 mehrmals pro Monat an den gleichen Stellen in und am bewaldeten Teil des Gartens ausgelegt. In Abbildung 22 sind die Bereiche markiert in denen die Fallen ausgelegt wurden.



Abbildung 22: Standort Stuttgart Botnang. Markiert in Schwarz: Grenzen des Gartens. Rot: Bereiche in denen Nagetiere gefangen wurden. Quelle (Google), Abfrage: 31.03.2017

Als Köder wurde Erdnussbutter in den Fallen verwendet. Das Auslegen der Fallen erfolgte abends und am nächsten Morgen wurden die gefangenen Nagetiere eingesammelt und bei -20°C bis zum Transport ins Landesgesundheitsamt Stuttgart eingefroren. Auch hierbei erfolgte der Transport in einer mit Trockeneis gefüllten Styroporbox um ein Auftauen der Proben zu verhindern. Anschließend wurden die toten Nagetiere bis zur Organentnahme bei -70°C gelagert. Tabelle 4 zeigt die am Standort Stuttgart Botnang in den Jahren 2015 und 2016 gefangenen Nagetierspezies.

Tabelle 4: Gefangene Nagetierarten am Standort Botnang in den Jahren 2015 und 2016

| Gefangene Nagetierarten 2015 | Gefangene Nagetierarten 2016 |
|--|--|
| Waldmaus (<i>Apodemus sylvaticus</i>) | Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>) |
| Gelbhalsmaus (<i>Apodemus flavicollis</i>) | Rötelmaus (<i>Myodes glareolus</i>) |
| Rötelmaus (<i>Myodes glareolus</i>) | |
| Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>) | |

2.1.4. Entnahme der Milchproduktproben

Sämtliche untersuchten Milchprodukte stammen vom Ziegenhof Loretto bei Zwiefalten und wurden aus Ziegenrohmlch hergestellt. Die Proben wurden von Mitarbeitern des Gesundheitsamtes Reutlingen am 16.06.2016 entnommen und an das Chemische- und Veterinäruntersuchungsamt übergeben. Dieses übergab die Proben an das Landesgesundheitsamt Stuttgart. Die untersuchten Milchprodukte stammen aus dem Zeitraum 04.06.2016 bis 15.06.2016. Zusätzlich wurden vier Proben genommen deren genaues Herstellungsdatum nicht bekannt war, die aber nach mündlicher Auskunft der Hofbesitzer aus den Monaten April und Mai stammen. Außerdem wurde die Bevölkerung der Region und Personen die bekanntermaßen in dem Hofladen einkaufen aufgerufen eventuell noch vorhandene Milchprodukte aus dem Untersuchungszeitraum an das Landesgesundheitsamt Stuttgart zu schicken. Dort gingen zwei weitere Käseproben auf dem Postweg ein welche ebenfalls untersucht wurden. Die Käseproben waren von der Käuferin bei -20°C

eingefroren worden. Diese Proben waren am 05.05.2016 in dem Hofladen gekauft worden. Ein genaues Herstellungsdatum ließ sich nicht mehr ermitteln.

2.1.5. Serumproben

Die untersuchten Serumproben stammen von verschiedenen Personen. Dabei wurde das Blut von medizinisch ausgebildetem Personal entnommen, etwa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert um für eine Gerinnung zu sorgen und anschließend wurden die Proben zentrifugiert um Blutkuchen und Serum zu trennen. Das Serum wurde abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bis zur Verwendung bei -20°C. In Tabelle 5 ist eine Übersicht der verwendeten Serumproben inklusive des Impfstatus der Personen und zusätzlichen Besonderheiten dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Serumproben insbesondere der Impfstatus gegen FSME

| Probenname | Impfstatus | Besonderheit |
|-------------------|---|---------------------|
| S1 | Grundimmunisierung | Gelbfieberimpfung |
| S2 | Keine Impfung | Gelbfieberimpfung |
| S3 | Grundimmunisierung und 2 Auffrischungen | Keine |
| S4 | Grundimmunisierung | Gelbfieberimpfung |
| S5 | 1. Impfung der Grundimmunisierung | Keine |
| S6 | Geimpft | Gelbfieberimpfung |
| S7 | Durchgemachte FSME-Infektion | Keine |

2.2. Methoden

2.2.1. Probengewinnung

2.2.1.1. Artbestimmung der geflaggtten Zecken

Die Bestimmung der Zecken bis zur Art wurde mittels der folgenden 3 Bestimmungsschlüssel durchgeführt: British Ticks (Arthur, 1963); Fauna D'Italia, Acari: Ixodida (Manilla, 1998) und Ticks of north-west Europe (Hillyard, 1996).

2.2.1.2. Homogenisieren der Zecken

Die eingefrorenen Zecken wurden aufgetaut und jeweils einzeln mit einer Pinzette in 2ml-Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße enthalten neben der Zecke zusätzlich 400µl Zellkulturmedium für FSME, sowie 3 Stahlkugeln mit einem Durchmesser von je 3mm. Als Zellkulturmedium wurde Earle's MEM (Minimum Essential Medium) (1x) 2,2g/l NaHCO₃ mit 0,1% Gentamycin und 1g/l Streptomycin verwendet. Das Zellkulturmedium wurde verwendet, um möglicherweise vorhandene FSME-Viren für eine spätere Anzucht im Labor zu erhalten. Anschließend wurden jeweils 20 Reaktionsgefäße in der Kugelmühle (MM400, Retsch) mit einer Frequenz von 30Hz für 10 Minuten gemahlen. Während dieses Vorgangs werden die Zecken durch die Stahlkugeln zerkleinert und so homogenisiert. Die Einzelhomogenate wurden anschließend bei 3000 rcf und 4°C abzentrifugiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Dadurch setzen sich mögliche Reste der Zecke (z.B. Stücke des Scutum) als Pellet am Boden ab und werden nicht in die Nukleinsäureaufreinigung überführt.

2.2.1.3. Probenname bei Milchprodukten

Untersucht wurden 3 verschiedene Arten von Milchprodukten, sowie Rohmilch. Bei Frisch-, Weich- und Hartkäse wurde jeweils eine Probe von einem Gramm entnommen und in 1ml MEM-Earle (1x) 2,2g/l NaHCO₃ mit 0,1% Gentamycin und 1g/l Streptomycin mit 3 Stahlkugeln (Ø3mm) homogenisiert. Das Vorgehen war dabei identisch mit dem der Zeckenhomogenisierung (siehe 2.2.1.2. Homogenisieren der Zecken)

2.2.1.4. Organentnahme Nagetiere

Die Nagetiere wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, um sie auf die Organentnahme vorzubereiten. Zuerst wurde dabei die Art bestimmt. Anschließend wurden mit einer Schere die Brusthöhle, der Bauchraum und der Schädel geöffnet und einzelne Organe entnommen. Bei den entnommenen Organen handelt es sich um Gehirn, Lunge und Milz. Anschließend wurde das Herz angeschnitten, um mit 1ml PBS (Phosphate buffered saline, Phosphatpuffer) eine Pleuraspülung vornehmen und etwas gelöstes Blut gewinnen zu können.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Nukleinsäureaufreinigung

Die Aufreinigung der Nukleinsäuren erfolgte mittels magnetischer Silikapartikel in verschiedenen Geräten. Flüssige Proben (Milch, Milchprodukte und Zeckenhomogenate) wurden mittels des NucliSens®easyMAG™ der Firma Biomerieux aufgereinigt, während die Nukleinsäuren der Organproben der Nagetiere durch ein Maxwell 16 Gerät der Firma Progamma extrahiert wurden.

2.2.2.1.1. Nukleinsäureaufreinigung der homogenisierten Proben

Die Aufreinigung der Nukleinsäuren homogenisierter Proben erfolgte mit dem Gerät NucliSens®easyMAG™ der Firma Biomerieux. Es arbeitet nach dem Prinzip der Silika-Adsorption. Dabei wurden die flüssigen Proben in einem ersten Schritt automatisch lysiert. Dies geschah durch die Zugabe von Guanidinthiocyanat (GIT) innerhalb des Gerätes. Dabei bewirkte das GIT nicht nur die Denaturierung der Proteine, sondern inaktivierte zusätzlich möglicherweise in den Proben vorhandene Nukleasen. Anschließend wurden manuell magnetische Silikapartikel zugegeben. Aufgrund der sehr hohen Salzkonzentration des Gemisches banden die Nukleinsäuren reversibel an die Silikapartikel. Diese Partikel konnten nun durch einen Magneten innerhalb des Gerätes bewegt und so in mehreren Schritten gewaschen werden. Während dieser Waschschrte wurden die Nukleinsäuren von allen anderen Zellbestandteilen getrennt und schließlich in einem Elutionspuffer mit niedrigem Salzgehalt gelöst.

Bei der Aufreinigung wurde folgendes Arbeitsprotokoll angewendet.

- Zentrifugieren der Proben bei 6000 x g für 5 Minuten
- Einsatz der jeweiligen Menge in die Kartuschen des Geräts und interne Lyse
- Nach Beendigung der Lyse (nach 10 Minuten) werden 50 µl magnetische Silika-Partikel gemischt mit 50µl RNase freiem H₂O zugegeben.
- Vollautomatische Aufreinigung im Gerät
- Elution in 55µl Elutionspuffer
- Überführen des Eluats in 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße und Mischen mit 1µl RNAsin
- Einfrieren bei -20°C bis zur weiteren Bearbeitung

Auf Grund der zu erwarteten sehr niedrigen Prävalenz von FSME-Viren in Zecken wurden die Homogenate in Pools zusammengefasst und die Nukleinsäuren aufgereinigt. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen (Tabelle 6):

Tabelle 6: Poolschema der verschiedenen Zeckenstadien für die Nukleinsäureaufreinigung

| Stadium | Zecken/Pool | Volumen/Zecke | Gesamtvolumen |
|---------|----------------------|---------------|---------------|
| Larve | 10 | 95 µl | 950 µl |
| Nymphe | 10 | 95 µl | 950 µl |
| Adult | 5 (m und w getrennt) | 100 µl | 500 µl |

Die Homogenate der Zeckenpools, in denen Virus-RNA nachgewiesen wurde, wurden im Anschluss einzeln aufgereinigt. Dabei wurden die in Tabelle 5 angegebene Menge je nach untersuchtem Stadium in die Nukleinsäureaufreinigung eingesetzt.

2.2.2.1.2. Nukleinsäureaufreinigung der Organproben

Die Nukleinsäureaufreinigung aus den Organproben erfolgte unter Verwendung des Maxwell 16 Tissue DNA Purification Kits in einem automatischen DNA-Extraktionsgerät (Maxwell® 16) im Landesgesundheitsamt Stuttgart (LGA). Auch bei diesem Verfahren wird die reversible Adsorption von Nukleinsäuren an Silikapartikel genutzt um verschiedene andere Probenbestandteile auszuwaschen. Dabei werden die Proben in Kammer 1 gegeben, wo sie durch einen eingesetzten Stößel mit Magnetkern mechanisch zerkleinert und in GIT-Puffer lysiert wird. Anschließend werden magnetische Silikapartikel aus Kammer 2 an den Plunger (Stößel mit Magnetkern) gebunden, welche dann wieder in Kammer 1 Nukleinsäuren binden. In den Kammern 3-7 erfolgen mehrere Waschschriffe, um schwach gebundene Verunreinigungen zu entfernen. Im Elutionsgefäß, in dem sich ein Nidrigsalzpuffer befindet, löst sich die DNA wieder von den Silikapartikeln. Hierbei wurden sämtliche Proben einzeln aufgereinigt.

2.2.2.2. PCR

Die Abkürzung PCR steht für Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion) und stellt eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten dar. Die Methode weist große Ähnlichkeit mit dem Vorgang der DNA-Replikation in Zellen auf und besteht aus drei Schritten, der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. Um einen bestimmten DNA-Abschnitt amplifizieren zu können, muss sowohl der Anfang, als auch das Ende der entsprechenden Sequenz bekannt sein. Durch jeden Zyklus der PCR verdoppelt sich theoretisch die Ausgangsmenge der DNA.

2.2.2.2.1. Prinzip der PCR

Um eine PCR durchzuführen benötigt man Oligonukleotide, die komplementär passend zu den Anfangs- und Endbereichen der Zielsequenz sind, dNTPs(Desoxyribonukleosidtriphosphate), Mg^{2+} -Ionen, Pufferlösungen sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase und technische Geräte. Die Oligonukleotide, auch Primer genannt, binden an die DNA-Vorlage in der Probe, sobald der Doppelstrang aufgeschmolzen ist und dienen als Startposition für die Polymerase, die den Bereich zwischen den Primern mit dNTPs passend ergänzt. Die Mg^{2+} -Ionen dienen der Stabilisierung der Primer und als Co-Faktor der DNA-Polymerase. Die PCR findet in der Form einer Wiederholung der drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation mit 20 bis 50 Zyklen statt. Dabei wird die Denaturierung der DNA in der entsprechenden Phase für etwa 1 Minute bei $95^{\circ}C$ durchgeführt. Dadurch brechen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen und es folgt das Annealing. In dieser Phase, die bei etwa $55^{\circ}C$ bis $60^{\circ}C$ stattfindet, kommt es zur Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Anschließend bindet während der Elongation die Polymerase an den Primer und ergänzt den Matrixstrang der DNA komplementär mit dNTPs. Dieser Schritt findet in Abhängigkeit der gewählten DNA-Polymerase bei ca. $72^{\circ}C$ statt.

2.2.2.2.1.1. Spezialfall Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR stellt einen Sonderfall der normalen PCR dar, da ihr kein DNA-Doppelstrang, sondern RNA zugrunde liegt. Hierbei wird der regulären PCR ein weiterer Schritt, die reverse Transkription, vorangestellt. Durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase wird dabei die zugrundeliegende RNA in cDNA umgeschrieben. Dabei wird zuerst ein RNA-DNA-Hybridstrang erzeugt, dessen RNA Anteil anschließend durch das Enzym abgebaut wird. Die so erzeugte cDNA dient als Template für die anschließende konventionelle PCR. Während dieser werden die reversen Transkriptasen denaturiert. Die hierfür verwendeten Polymerasen stammen aus verschiedenen Retroviren.

Eine RT-PCR kann in zwei Einzelreaktionen durchgeführt werden. Dabei wird in einem ersten Schritt die RNA in cDNA umgeschrieben, welche in einem zweiten Ansatz als Template für die Amplifikation dient. Alternativ kann eine „One-Step-RT-PCR“ durchgeführt werden, bei der sowohl das Umschreiben der RNA in cDNA, als auch die Amplifikation in einem Reaktionsansatz geschehen. Die Durchführung in einem Ansatz vermindert das Risiko von Kontaminationen. Hierfür werden thermostabile DNA-Polymerase benötigt, da diese während der reversen Transkription bereits mit im Ansatz enthalten sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der One-Step-RT-PCR-Technik gearbeitet.

2.2.2.2.2. Prinzip der qualitativen real time-PCR (qrt-PCR) im LightCycler®

Eine Real-Time-PCR funktioniert nach demselben grundlegenden Prinzip wie eine konventionelle PCR, wird jedoch um einen wichtigen Faktor erweitert. Dabei handelt es sich um eine Fluoreszenzsonde, die gleich mehrere Vorteile bietet. Sie ermöglicht nicht nur die Detektion der Amplifikate bereits während der PCR-Reaktion, sondern auch eine Quantifizierung der DNA zu Beginn der PCR. Die Mengenbestimmung wird durch den proportionalen Anstieg der Fluoreszenz im Verhältnis zur Amplifikatmenge ermöglicht. Des Weiteren bindet die Sonde komplementär innerhalb der Zielsequenz wodurch unspezifische Amplifikate nicht detektiert werden. Alternativ kann auch ein interkalierender Farbstoff wie beispielsweise SYBR Green I verwendet werden. Da dieser jedoch keine Steigerung der Spezifität ermöglicht und in dieser Arbeit nicht verwendet wurde, wird nicht weiter darauf eingegangen.

Grundsätzlich funktionieren die meisten Fluoreszenzsonden nach dem FRET-Prinzip. Die Abkürzung FRET steht hierbei für „Förster-Resonanzenergietransfer“, benannt nach seinem Entdecker Theodor Förster. Eine FRET-Sonde besteht dabei immer aus zwei Teilen; einem Donor- und einem Akzeptor-Fluorochrom. Befinden sich die beiden Fluorochrome in ausreichender räumlicher Nähe zueinander und wird das Donor-Fluorochrom durch eine Lichtquelle angeregt, so gibt es einen Teil dieser Energie an das Akzeptor-Fluorochrom ab, der wiederum ein Fluoreszenzsignal aussendet, das messbar ist. Dabei gilt: Je weiter die beiden Fluorochrome entfernt sind, desto schwächer ist das Signal des Akzeptors. Am häufigsten werden entweder TaqMan-Sonden oder Hybridisierungs sonden genutzt.

Eine TaqMan-Sonde besitzt dabei an einem Ende einen Quencher und am anderen Ende einen Reporter. Solange die Sonde noch nicht eingebaut ist, wird die Energie des Reporters durch den FRET-Effekt auf den Quencher übertragen und die Fluoreszenz somit unterdrückt. Wird die Sonde aber eingebaut, so wird sie im Laufe des Elongationsschritts durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase gespalten. Quencher und Reporter entfernen sich voneinander und die Fluoreszenz wird messbar. Die Messung erfolgt immer am Ende der Elongation, nachdem alle eingebauten Sonden gespalten wurden.

Zusätzlich ist bei dieser PCR-Technik eine Quantifizierung der in der Probe enthaltenen Erregermenge möglich. Dies geschieht durch den sogenannten Ct-Wert (Ct: Cycle Threshold = Zyklus-Schwellwert).

Dieser Wert gibt die Zykluszahl an, ab der die gemessene Fluoreszenz der Probe den unspezifischen Fluoreszenzwert der Sonde überschreitet. Hierbei bedeutet ein niedriger Ct-Wert, dass die Probe viel Ziel-RNA bzw. Ziel-DNA enthält. Ein Ct-Wertunterschied von 3,3 entspricht hierbei etwa einem Verhältnis von 1:1000. Ausgehend von einer Positivkontrolle, deren Erregergehalt bekannt ist, lässt sich die Erregermenge in einer zu untersuchenden Probe bestimmen. Die molekularbiologischen Nachweise wurden an einem LightCycler 1.5 der Firma Roche vorgenommen. In diesem Gerät ist eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung und somit eine durchgängige Quantifizierung der Amplifikate möglich. Durch den runden Aufbau und die Luftzufuhr von oben ist eine sehr schnelle Temperaturänderung möglich, da alle Glaskapillaren gleichmäßig belüftet werden. Diese Glaskapillaren fungieren gleichzeitig auch als Küvetten und werden durch den Steppermotor zur photometrischen Messung über dem Messsystem positioniert, in dem ein System aus Spiegeln, Filtern und Photodioden die Fluoreszenz der Proben misst.

2.2.2.3. Prinzip der Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein analytisches Verfahren zur Auftrennung von Molekülen verschiedener Größe. Bei diesem Verfahren wird ein Gel (hier: Agarosegel) als molekulares Sieb genutzt, durch das verschieden große Moleküle unterschiedlich schnell wandern können. Je größer die Moleküle, desto langsamer sind sie. In der vorliegenden Arbeit wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Bei der Herstellung werden 0,5g Agarose unter Kochen in 50ml 1xTBE-Puffer gelöst. Sobald das Gel nur noch etwa handwarm ist wird der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben. Dieser lagert sich während der Elektrophorese in die DNA ein und macht sie so mittels UV-Licht detektierbar. Anschließend wird das noch flüssige Gel in einen Gelträger gegossen und es werden Kämme für die Kammern eingesetzt. Sobald das Gel ausgehärtet ist, werden die Kämme entfernt und der Gelträger in die Elektrophoresekammer überführt. Während der gesamten Elektrophorese ist das Gel mit 1xTBE-Puffer überschichtet. Da DNA negativ geladen ist wandert sie beim Anlegen einer Gleichspannung in Richtung des Pluspols. Um jedoch die im Gel zurückgelegte Distanz beurteilen zu können wird eine DNA-Ladder (100bp-Ladder) mitgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung unterschiedlicher Nukleotide bekannter Länge (100bp-Schritte: 100bp bis 2500bp).

Um die entstandenen DNA-Banden nach der Elektrophorese sichtbar zu machen wird das Gel in eine UV-Kammer überführt und die Banden können dort dokumentiert werden. Durch die Belichtung des Gels mit UV-Licht wird das enthaltene Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt. Abbildung 23 zeigt diese Abläufe schematisch.

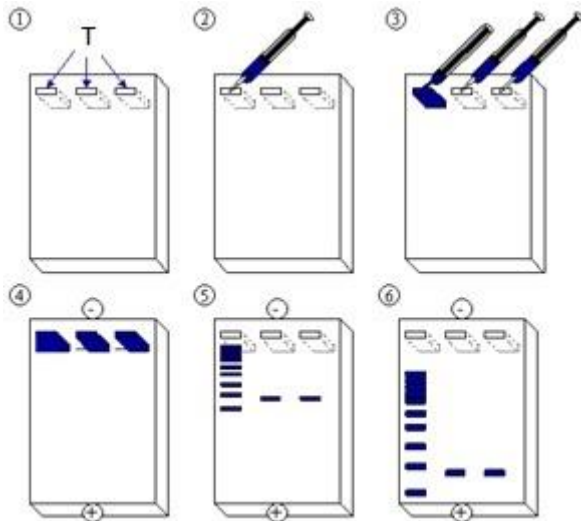


Abbildung 23: Schematischer Ablauf einer Gelelektrophorese. T bezeichnet hier die Taschen. "+" und "-" bezeichnen die jeweiligen Pole der angelegten Gleichspannung. Quelle: verändert nach: <http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose-Gelelektrophorese>

2.2.3. Molekularbiologischer Erregernachweis

2.2.3.1. Nachweis von FSME-Viren

Der Erregernachweis von FSME-Viren erfolgte mittels einer One-Step RT-qrt-PCR. Dabei handelt es sich um eine reverse Transkriptase-quantitative real time PCR. Diese kann in einem Schritt, also ohne Unterbrechung, durchgeführt werden. Zuerst wird dabei die RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Das zugrundeliegende Protokoll wurde von (Schwaiger, et al., 2003) übernommen. Bei dieser PCR wird ein 68 Basenpaar (bp) großes Fragment der 3'-nichtkodierenden Region des FSME-Virus Genoms amplifiziert. Es wurde der LightCycler® RNA Master HybProbe Kit der Firma Roche verwendet. Bei jeder PCR wurden sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativkontrolle mitgeführt um die PCR zu überwachen. Als Positivkontrolle diente Zellkulturüberstand aus Versuchen, in denen FSME-Viren in Zellen vermehrt wurden, in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:100. Die Positivkontrolle dient dem Ausschluss falsch negativer Ergebnisse, die durch PCR-Inhibitoren im Reaktionsansatz hervorgerufen werden können. Die ursprüngliche Probe war durch Sequenzierung bestätigt worden. Als Negativkontrolle wurde zweifach destilliertes H₂O verwendet. Die Negativkontrolle dient dem Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse, die beispielsweise durch Kontamination mit erregerehaltigem Material im Reaktionsansatz entstehen können.

Sequenzen der Primer und Sonde:

Tabelle 7: Sequenz der Primer und Sonde der FSME-V-PCR

| Primer/Sonden | Sequenz (5'-3') |
|------------------|--|
| F-TBE 1 (Primer) | 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC |
| R-TBE 1 (Primer) | 5'ACACATCACCTCCTTGTCAGACT |
| TBE-wt (Sonde) | 5'-6FAM-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-TMR-3' |

Inhaltsverzeichnis

Reaktionsansatz für eine Probe:

Tabelle 8: Pipettierschema pro Probe FSME-V PCR

| | | Menge in μ l |
|------------------------------|---------|------------------|
| Primer (5pmol/ μ l) | F-TBE 1 | 0,5 |
| | R-TBE 1 | 0,5 |
| Sonde (4pmol/ μ l) | TBE-wt | 0,5 |
| Mn (50mM stock solution) | | 0,65 |
| Enzym Mix | | 3,75 |
| H ₂ O (PCR clean) | | 1,6 |
| Probe | | 2,5 |
| Gesamt | | 10 |

Es wurde das LightCycler® RNA Master HybProbe Kit verwendet. Dabei enthält der Enzym Mix den PCR-Puffer, dNTPs, sowie die Tth-Polymerase und ist bereits in dieser Form im Kit enthalten. Die genaue Zusammensetzung ist nicht angegeben.

Temperaturprofil der RT-qrt-PCR:

Tabelle 9: Temperaturprofil der RT-qrt-PCR für FSME-Viren.

| | RT | Denaturierung | Denaturierung | Annealing + Elongation | Cooling |
|-------------------|-------|---------------|---------------|------------------------|---------|
| Temperatur | 60°C | 95°C | 95°C | 60°C | 40°C |
| Dauer | 20min | 2min | 5s | 15s | 30s |
| Zyklen | 1 | 1 | 50 | | 1 |

2.2.3.2. E-Gen-PCR zur Sequenzierung der FSME-Viren

Um FSME-Viren phylogenetisch untersuchen zu können, ist es nötig, einen relativ stabilen Teil des Genoms zu sequenzieren. Dazu wurde in dieser PCR das 1488bp lange E-Gen (E=Envelope) amplifiziert. Das PCR-Protokoll sowie die verwendeten Primer wurden aus Kupca et al. (2010) übernommen. Es wurde das SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity von Invitrogen™ verwendet. In diesem Kit sind zwei verschiedene Enzyme, je eins für die reverse Transkription und eins für die DNA-Polymerisation, enthalten. Auch hierbei wird zunächst die Virus-RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. In dieser PCR werden 2 verschiedene Rückwärtsprimer verwendet, da die Zielsequenz in diesem Bereich einen Nukleotidaustausch aufweist und nur so gewährleistet wird, dass ein passender Rückwärtsprimer verfügbar ist. Die beiden Rückwärtsprimer (TBE-c2571a und TBE-c2571b) wurden deshalb in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und unter dem Namen TBE-c2571c im Pipettierschema der E-Gen-PCR geführt.

Sequenzen der Primer:

Tabelle 10: Sequenz der Primer der E-Gen PCR

| Primer | Sequenz (5'-3') |
|----------------------|------------------------|
| TBE-885 (forward) | GGTTACCGTTGTGTGGTTGACC |
| TBE-c2571a (reverse) | CTCCGGGTAGTAGGCATAATTG |
| TBE-c2571b (reverse) | CTCCGGGTAGTATGCATAATTG |

Pipettierschema der E-Gen PCR:

Tabelle 11: Pipettierschema pro Probe E-Gen PCR

| | | Menge in μ l |
|------------------------------|-----------|------------------|
| Primer (5pmol/ μ l) | TBE-885 | 2 |
| | TBE-2571c | 2 |
| 2x Reaction Mix | | 25 |
| Enzym Mix | | 2 |
| H ₂ O (PCR clean) | | 14 |
| Probe | | 5 |
| Gesamt | | 50 |

Temperaturprofil der E-Gen-PCR:

Tabelle 12: Temperaturprofil der E-Gen PCR. RT.: Reverse Transkription, Denat.: Denaturierung

| | RT | Denat. | Denat. | Annealing | Elongation | Elongation | Cooling |
|------------|-------|--------|--------|-----------|------------|------------|----------|
| Temperatur | 50°C | 94°C | 94°C | 54°C | 68°C | 68°C | 4°C |
| Zeit | 45min | 5min | 30s | 30s | 2min | 10min | ∞ |
| Zyklen | 1 | | 40 | | | 1 | |

2.2.3.3. Nachweis von Hanta-Viren

Um mögliche Zusammenhänge zwischen den Prävalenzen von Hanta-Viren und FSME-Viren in einem FSME-Fokus beurteilen zu können wurden Lungengewebsproben von Nagetieren des FSME-Fokus in Stuttgart Botnang molekularbiologisch auf den humanpathogenen Hanta-Virustypen Puumala getestet. Dieser Nachweis erfolgte mittels zweier PCRs. Dabei handelt es sich bei der ersten um eine RT-PCR, bei der die Hanta-Virus RNA in cDNA umgeschrieben und bereits ein 760bp langes Fragment des S-Segments (small-segment) amplifiziert. Dies ist durch ein One-Step-RT-PCR Kit möglich, in dem bereits eine reverse Transkriptase und eine Hot-Start Polymerase enthalten sind. Anschließend wird in einer nested PCR ein kleinerer Teil des S-Segments von 331bp Länge, der innerhalb des ersten Amplifikats liegt, vervielfältigt. Anschließend erfolgt die Detektion mittels eines Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels. Die verwendete PCR-Methode stammt aus Essbauer, et al., 2006. Dabei wurden die in Tabelle 13 dargestellten Primer verwendet.

Inhaltsverzeichnis

Tabelle 13: Verwendete Primer der 1. und 2. PCR zum Nachweis von Puumala-Viren

| PCR | Primername | Sequenz |
|--------|------------|----------------------------|
| 1. PCR | PU 342f | 5'-TATGGTAATGTCCTTGATGT-3' |
| | PU 1102r | 5'-GCCATDATDGTRTTYCTCAT-3' |
| 2. PCR | PU 390f | 5'-GGNCARACAGCRGATTGGT-3' |
| | PU 721r | 5'-CHCCATNACWGGRCYAT-3' |

Die 1. PCR wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Tabelle 14: Pipettierschema pro Probe; 1.Hanta-PCR

| | | Menge in μ l |
|------------------------------|---------|------------------|
| Primer (5pmol/ μ l) | PU342F | 5 |
| | PU1102R | 5 |
| 2x Reaktionspuffer | | 25 |
| SuperscriptIII/Platinum Taq | | 2 |
| RNasin | | 1 |
| H ₂ O (PCR clean) | | 7 |
| Probe | | 5 |
| Gesamt | | 50 |

Hierbei wurde das PCR-Kit SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase von Invitrogen™ verwendet.

Bei der 2. PCR wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 15: Pipettierschema pro Probe; 2.Hanta-PCR

| | | Menge in μ l |
|------------------------------|--------|------------------|
| Primer (5pmol/ μ l) | PU390F | 5 |
| | PU721R | 5 |
| 5x PCR-Puffer | | 10 |
| MgCl ₂ (25mM) | | 2,5 |
| Go-Taq (5u/ μ l) | | 0,3 |
| dNTPs (1,25mM) | | 5 |
| H ₂ O (PCR clean) | | 21,2 |
| Probe | | 1 |
| Gesamt | | 50 |

Hierbei wurde das GoTaq System von Promega mit dem dazu gehörigen Puffer und Magnesiumchlorid verwendet.

Allerdings wurden folgende, veränderte Temperaturprofile aus der Abteilung Molekularbiologie des Landesgesundheitsamts verwendet.

Temperaturprofil der 1. PCR

Tabelle 16: Temperaturprofil der 1. Hanta-PCR. RT.: Reverse Transkription, Denat.: Denaturierung, Anneal.: Annealing, Elong.: Elongation

| | RT | Denat. | Denat. | Anneal. | Elong. | Elong. | Kühlen |
|---------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| Temp. | 46°C | 94°C | 94°C | 46°C | 68°C | 60°C | 4°C |
| Dauer | 15 min | 2 min | 15 sek | 30 sek | 45 sek | 5 min | ∞ |
| Zyklen | 1 | | 45 | | | 1 | |

Temperaturprofil der 2. PCR

Tabelle 17: Temperaturprofil der 2. Hanta-PCR. Denat.: Denaturierung, Anneal.: Annealing, Elong.: Elongation

| | Denat. | Denat. | Anneal. | Elong. | Elong. | Kühlen |
|---------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| Temp. | 95°C | 94°C | 47°C | 72°C | 72°C | 4°C |
| Dauer | 3 min | 30 sek | 30 sek | 30 sek | 10 min | ∞ |
| Zyklen | 1 | 35 | | | 1 | |

2.2.3. Prinzip der Zellkultur

Die Zellkultur stellt eine Untersuchungsmethode dar, bei der Zellen eines Lebewesens oder einer Pflanze in unterschiedlichen Behältnissen vermehrt werden. Dies geschieht in Zellkulturmedien, die den Zellen alle benötigten Nährstoffe zur Verfügung stellen. So ist es möglich Vorgänge innerhalb von Zellen zu untersuchen, oder Pathogene zu vermehren, ohne den eigentlichen Wirt zur Verfügung zu haben. Sämtliche zellkulturellen Versuche wurden in einem BSL 3 Labor im Landesgesundheitsamt Stuttgart durchgeführt. Die einzige Ausnahme dazu stellt die Durchführung des Neutralisationstests dar. Dieser wurde in einem BSL 3**-Labor des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr in München durchgeführt.

2.2.3.1. Verwendung verschiedener Zelllinien

Es wurden 4 verschiedene Zelllinien verwendet, die aus der Zelliniensammlung des Landesgesundheitsamts stammen. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und fünf Prozent CO₂ angezüchtet. Die PS-Zellen stellen dabei die einzige Ausnahme dar, da sie bei null Prozent CO₂ gehalten wurden. Zur Kultivierung wurde Earle's MEM mit fünf Prozent fetalem Kälberserum (FKS), einem Prozent Vitaminen sowie 0,1% Gentamycin und 0,1% Streptomycin verwendet. Tabelle 18 zeigt die entsprechenden Zelllinien, sowie die Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 18: Verwendete Zelllinien, Zelltyp und Herkunftsspezies, sowie Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien.

| Zelllinie | Zelltyp und Spezies | Kultivierungsbedingungen |
|-----------|------------------------------------|--------------------------|
| PS | Schweineniere | 37°C 0% CO ₂ |
| A549 | Adenokarzinom, human | 37°C 5% CO ₂ |
| Vero B4 | Nierenzellen, Chlorocebus aethiops | 37°C 5% CO ₂ |
| MA23 | Fibroblasten, Human | 37°C 5% CO ₂ |

2.2.3.2. Anzucht der Zellen aus gefrorenem Material

Alle Zelllinien wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut um die Bildung von Eiskristallen, die zu einer Schädigung der Zellen führen würden, zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen in 9ml Zellkulturmedium aufgenommen und 5 Minuten bei 1200g zentrifugiert. Das dabei entstandene

Zellpellet wurde anschließend in 5ml frisches Medium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt um den Zellen neue Nährstoffe zur Verfügung zu stellen. Die Anzucht erfolgte über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen bei 37°C bis sich ein Zellrasen gebildet hatte. Anschließend wurden die Zellen in größere Flaschen überführt.

2.2.3.3. Splitten der Zellen

Das Splitten einer Zellkultur beschreibt das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche und das Überführen in eine oder mehrere neue Flasche(n) zur weiteren Vermehrung. Zu diesem Zweck wird zuerst das alte Medium abgenommen. Anschließend wird die Zellkultur mit PBS gewaschen. Die dabei verwendete Menge richtet sich nach der Größe der verwendeten Flasche und ist in Tabelle 19 aufgeführt. Dieser Waschschrift ist nötig um das im Zellkulturmedium enthaltene FKS vollständig zu entfernen, da dies den Vorgang des Abtrypsins hemmt.

Tabelle 19: Zusammenhang Größe der Zellkulturflaschen und verwendete Menge an PBS zum Waschen bzw. verwendete Menge Trypsin in EDTA zum Ablösen der Zellen.

| Fläche der Zellkulturflasche | Verwendete Menge PBS | Verwendete Menge Trypsin in EDTA |
|------------------------------|----------------------|----------------------------------|
| 25cm ² | 5ml | 5ml |
| 75cm ² | 10ml | 10ml |
| 175cm ² | 30ml | 15ml |

Anschließend wird eine ebenfalls von der Flaschengröße abhängige Menge an Trypsin in EDTA auf die Zellkultur gegeben um die Verbindungen zwischen den Zellen, sowie zwischen Zellen und Flaschenboden zu zerstören. Tabelle 17 zeigt die verwendeten Mengen an Trypsin. Die Flaschen wurden anschließend für 5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wird die Trypsinreaktion abgestoppt. Dies geschieht durch Zugabe der doppelten Menge an Zellkulturmedium mit drei Prozent FKS. Danach wird die gesamte Flüssigkeit inklusive der enthaltenen Zellen durch eine Pipette entnommen und in ein 5ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wird für 5 Minuten bei 260g abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in neuem Medium gelöst. Die so gelösten Zellen werden auf neue Zellkulturflaschen verteilt, mit Wachstumsmedium überschichtet und die Entwicklung täglich mikroskopisch überprüft.

2.2.3.4. Anzucht von FSME Viren

Die Anzucht der FSME-Viren erfolgte unabhängig vom Ausgangsmaterial immer nach demselben Protokoll. Lediglich die Menge an eingesetztem Probenmaterial unterscheidet sich. Ausgehend von einer bereits mit einem Zellrasen bewachsenen Zellkulturflasche wurde zuerst das alte Zellkulturmedium abgenommen. Anschließend wurde 1 ml Medium und die entsprechende Menge Probenmaterial (Tabelle 20) zugegeben und durch leichtes Schwenken über den Zellen verteilt. Dadurch waren die Zellen knapp bedeckt. Danach folgte ein Inkubationsschritt von 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Zuletzt wurde das Zellkulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt.

Tabelle 20: Verwendete Menge an Ausgangsmaterial zur Virusanzucht nach Material und Verwendungszweck

| Anzuchtmaterial | Zweck | Eingesetzte Menge in μl |
|---------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Zellkulturüberstand | Kontrolle in Experiment | 100 |
| Zellkulturüberstand | Vermehrung der Viren | 1000 |
| Zeckenhomogenat | Erste Anzucht | 100 |
| Milchprodukt | Erste Anzucht | 400 |

Die Vermehrung des Virus wurde anhand des zytopathischen Effekts (CPE) mikroskopisch beurteilt und mittels PCR (siehe 2.2.3.1. Nachweis von FSME-Viren) überprüft. Dabei wird das Abkugeln und Ablösen der Zellen vom Flaschenboden als CPE gewertet. Hierbei wurden 5 Stufen des CPE unterschieden (Tabelle 21).

Tabelle 21: Darstellung der CPE Stufen und deren Bedeutung

| Stufe des CPE | Bedeutung |
|---------------|---|
| 1 | Geschlossener Zellrasen |
| 2 | Weniger als 25% des Zellrasens zerstört |
| 3 | Weniger als 50% des Zellrasens zerstört |
| 4 | Weniger als 75% des Zellrasens zerstört |
| 5 | Zellrasen komplett zerstört |

Die Probennahme erfolgte bei Stufe 5 oder nach 7 Tagen; abhängig davon was früher erreicht war. Probenmaterial, das im ersten Versuch nicht erfolgreich angezüchtet werden konnte, wurde sterilfiltriert und anschließend dreimal subkultiviert. Dazu wurde das gesamte Zellkulturmedium der Ausgangskultur durch einen Filter der Porengröße $0,2\mu\text{m}$ sterilfiltriert und anschließend auf eine neue Zellkultur gegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde das Medium auf 5ml aufgefüllt. Sofern auch im vierten Versuch keine Anzucht möglich war, wurde die Anzucht von neuem Probenmaterial ausgehend begonnen.

2.2.3.5. Untersuchung zum Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Viren in verschiedenen Zelllinien

Um das Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Viren in unterschiedlichen Zelllinien zu untersuchen wurden die Zellen in 24-well Platten wie in „2.2.3.1. Verwendung verschiedener Zelllinien“ beschrieben angezüchtet. Sobald sich ein durchgängiger Zellrasen gebildet hatte, wurden FSME-Viren in 0,5ml Zellkulturmedium dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wurde zusätzliche 0,5ml Zellkulturmedium dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen alle 24 Stunden kontrolliert und die Stufe der CPE wie in Tabelle 19 dargestellt dokumentiert. Tabelle 20 zeigt die dabei verwendeten Virusstämme und deren Herkunft. Alle Versuche wurden in einem Doppelansatz und in Verdünnungsschritten (Ausgangsmaterial, 1:10, 1:100, 1:1000) durchgeführt, wobei das Ausgangsmaterial vorher per qrt-PCR auf FSME-Viren getestet wurde und dann so verdünnt wurde, dass das Ausgangsmaterial“ bei allen Stämmen den gleichen CT-Wert in der qrt-PCR zeigte.

Tabelle 22: Verwendete Virusstämme und deren Herkunft

| Virusstamm | Herkunft |
|------------|--------------------------------|
| Hypr | Humanes Isolat Tschechien |
| EN N858 | Zeckenisolat Emmendingen |
| K5 | Milchprodukt Lorettobach |
| M7-5b | Zeckenisolat Gengenbach |
| B185 | Zeckenisolat Stuttgart Botnang |

2.2.3.6. Theorie des Neutralisationstests

Ein Neutralisationstest dient dem Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Blutseren. Zu diesem Zweck werden verschiedene Verdünnungsstufen des Probenersums mit einer vordefinierten Menge an Virusmaterial vermischt. Neutralisierende Antikörper binden an die Virionen und verhindern so, dass diese in Zellen eindringen können. Das Gemisch wird auf eine Zellkultur gegeben und nach einer Inkubationsphase mit einem Medium überschichtet, das sicherstellt, dass sich freigesetzte Viren nur auf benachbarte Zellen ausbreiten und nicht durch das Zellkulturmedium auch weiter entfernte Zellen infizieren können. Es bilden sich Plaques. Untersucht wird ab welcher Verdünnungsstufe die Bildung von 90% der normalerweise gebildeten Plaques durch das Proben Serum inhibiert wird. Die letzte Verdünnungsstufe, auf die dies zutrifft wird als Titer bezeichnet.

Das Testverfahren ist deutlich aufwändiger als andere immunologische Untersuchungen, da es eine Zellkultur und mehr Zeit erfordert, stellt aber gleichzeitig auch die einzige Möglichkeit zum Nachweis neutralisierender Antikörper dar.

2.2.3.6.1 Durchführung des Neutralisationstests

Die Durchführung eines Neutralisationstests gliedert sich in 7 Schritte. Im ersten Schritt wurde das Proben Serum inaktiviert. Dies geschah durch eine Inkubation bei 56°C für 30 Minuten. Dieser Schritt war nötig um möglicherweise im Serum enthaltene Komplementbestandteile zu inaktivieren. Die Antikörper werden hierbei nicht inhibiert. Anschließend wurde im zweiten Schritt die Probe verdünnt. Dabei wurde das in Tabelle 23 dargestellte Schema verwendet.

Tabelle 23: Schema zur Herstellung der Verdünnungsstufen

| Menge Serum in µl | Menge Zellkulturmedium in µl | Verdünnungsstufe |
|-------------------|------------------------------|------------------|
| 30 | 570 | 1:20 |
| 300 | 300 | 1:40 |
| 300 | 300 | 1:80 |
| 300 | 300 | 1:160 |
| 300 | 300 | 1:320 |
| 300 | 300 | 1:640 |

Außerdem wurde ein Gemisch aus Virus und Zellkulturmedium hergestellt, dessen Anzahl an Plaque bildenden Einheiten (PIU) bekannt war. Dieser Virusstamm wurde aus einem Pool von drei männlichen Zecken der Art *Dermacentor reticulatus*, die aus der Gegend um Leipzig stammt, isoliert. Dieser Stamm wurde gewählt, da er klar abgegrenzte Plaques bildet. Im folgenden Schritt wurden jeweils 150µl des verdünnten Serums mit 150µl Virus vermischt. Diese Mischung wurde eine Stunde

lang bei 37°C inkubiert um eine vollständige Reaktion zwischen Antikörpern und Viren zu ermöglichen. Anschließend wurden in einem Doppelansatz jeweils 150µl des Gemischs in jede Vertiefung einer 24-well Platte gegeben und wieder für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Im folgenden Schritt wurde die Zellkultur mit einer Lösung aus 1,25% Methylzellulose in Zellkulturmedium überschichtet. Dadurch konnten Viren, die aus einer Zelle freigesetzt wurden nur direkt benachbarte Zellen infizieren und sich nicht über das Zellkulturmedium in der gesamten Zellkultur verbreiten. Nach einer Woche wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Durch die Färbung lassen sich die entstandenen Plaques mit bloßem Auge auszählen. Abbildung 24 zeigt exemplarisch das Schema, das beim Einbringen des Probenmaterials auf die Platten verwendet wurde. Zusätzlich wurde ebenfalls eine Viruskontrolle im Doppelansatz als Positivkontrolle mitgeführt.

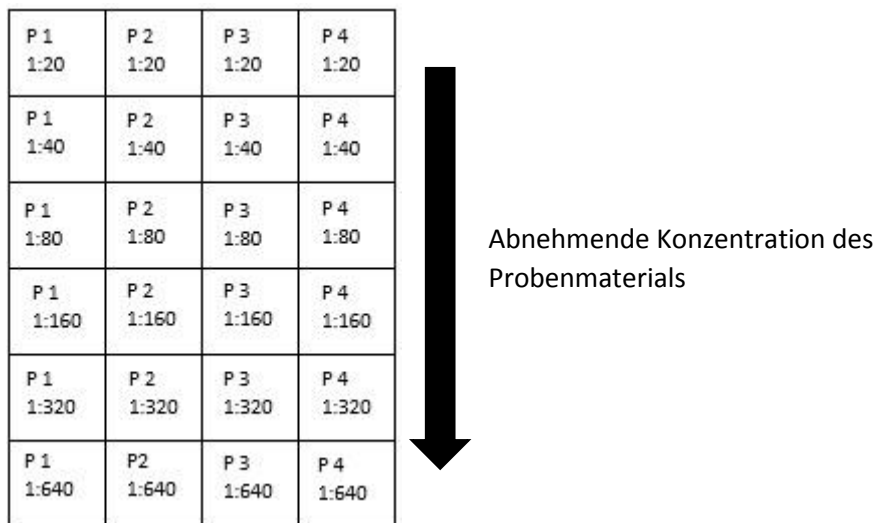


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Proben und Verdünnungsstufen auf der Platte. Konzentration von oben nach unten abnehmend.

2.2.4. Prinzip der Sequenzierung

Es bezeichnet die Feststellung der Nukleotidfolge innerhalb eines DNA-Moleküls. Dabei kommt die klassische Form der Sanger Sequenzierung zur Anwendung. Diese Methode wird als Didesoxymethode nach Sanger oder als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet. Sie wurde von Sanger und Coulson 1977 veröffentlicht. Dabei werden bei der Synthese neben den regulären dNTPs zusätzlich ddNTPs (Didesoxyribonukleotidtriphosphate) eingebaut. An diese ddNTPs können keine weiteren dNTPs angehängt werden, sodass die Kette abbricht. Im Anschluss an die Sequenzierreaktion werden die Fragmente mit definiertem Abbruch anschließend in einer Kapillargelelektrophorese aufgetrennt.

Die Sequenzierung wird in 4 Teilschritte unterteilt. Zuerst erfolgt die Aufreinigung der PCR-Amplifikate. Der zweite Schritt ist das Cycle Sequencing. Anschließend erfolgt die Aufreinigung der Sequenzierprodukte und abschließend, im vierten Schritt die Kapillargelelektrophorese.

2.2.4.1. Prinzip der Amplifikataufreinigung

Es wurden die Amplifikate der E-Gen-PCR sequenziert um die FSME-Viren phylogenetisch einordnen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Amplifikate mittels des QIAquick PCR Purification Kits der Firma Qiagen aufgereinigt. Zuerst wurden die Amplifikate im Verhältnis 1:5 mit dem PB-Puffer

(Bindepuffer) gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf die Säulen gegeben, und für 1 Minute bei 16000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden zwei Waschschriffe durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde 0,75ml PE-Puffer (Waschpuffer) zugegeben und anschließend jeweils für eine weitere Minute bei 16000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und die Zentrifugation wiederholt. An dieser Stelle wurde ein im Handbuch nicht aufgeführter, zusätzlicher Schritt eingefügt. Die Säulen wurden mit geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei 56°C in einem Ofen getrocknet, um das im PE-Puffer enthaltene Ethanol zu entfernen das ansonsten die Sequenzierreaktion inhibieren könnte. Um die DNA wieder zu eluieren, wurde die Säule auf ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß umgesetzt und 100µl EB-Puffer auf die Säule gegeben und anschließend für 1 Minute bei 16000g zentrifugiert.

2.2.4.2. Prinzip des Cycle Sequencing

Das „Cycle sequencing“ stellt die eigentliche Sequenzierung dar. Hierbei erfolgt die Amplifikation der im vorherigen Schritt aufgereinigten PCR-Produkte und der Einbau der fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Neben der Fluoreszenz fehlt diesen Basen die Hydroxyl-Gruppe am 3'-Ende. Dadurch können Phosphodiester-Bindungen ausgebildet und somit keine weiteren dNTPs oder ddNTPs angeknüpft werden. Die DNA-Polymerase bricht ab, sobald eine solche Base eingebaut wird. Dabei ist jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass sie identifiziert werden können. Statt wie bei einer PCR mindestens einen forward und einen reverse Primer zu verwenden wird diese Reaktion für jeden Primer separat durchgeführt. Ein weiterer Unterschied zur PCR liegt in der verwendeten Polymerase, die keine 5'-3' Exonuklease-Aktivität besitzt und somit die Primer nicht entfernen kann. Dadurch haben alle Amplifikate die gleiche Orientierung und folglich sind alle Fragmente derselben Länge am Ende mit dem gleichen Fluoreszenzsignal ausgestattet.

2.2.4.3. Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Zuerst werden die Sequenzierprodukte mit SDS (Natriumdodecylsulfat) gemischt, um so die zusammen gelagerten ddNTPs zu trennen. Dies ist nötig, um die überflüssigen ddNTPs durch die Aufreinigung entfernen zu können. Durch die Entfernung der nicht eingebauten ddNTPs wird die Hintergrundfluoreszenz reduziert und damit das Ergebnis der Sequenzierung verbessert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung durch Gelfiltration, mittels des DyeEx™2.0 Spin Kits von Qiagen. Hierbei werden die Proben nach dem Cycle Sequencing mit 2µl 2,2%iges SDS gemischt. Anschließend erfolgt ein 3minütiger Denaturierungsschritt bei 94°C im Blockcycler. Danach werden die Proben unverzüglich auf Eis gelagert und 20 Sekunden lang bei 16000g zentrifugiert. Anschließend befindet sich das aufgereinigte Sequenzierprodukt im Durchfluss.

2.2.4.4. Prinzip der Kapillargelelektrophorese

Die Auftrennung erfolgt dabei direkt vor der Fluoreszenzmessung mit Hilfe einer Kunststoffkapillare. Dabei dient ein Polyacrylamid-Gel als Grundlage. Durch das Anlegen einer Hochspannung werden die Fragmente nach ihrer Größe getrennt. Dabei wandern die kürzeren Stücke weiter durch das Gel als die größeren. Im Anschluss können die Fragmente in der entsprechenden Reihenfolge durch Anregung mit einem Laser und Messen der Fluoreszenz detektiert werden. Die Umwandlung der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Computer.

2.2.4.5. Sequenzierung der Proben durch die Firma GATC Biotech AG

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma GATC Biotech AG übergeben. Zu diesem Zweck wurden die Amplifikate wie in 2.2.4.1. Prinzip der Amplifikataufreinigung beschrieben aufgereinigt und diese Aufreinigungen nach Firmenangaben vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden pro Probe jeweils 5µl aufgereinigtes Amplifikat in einzelne 1,5ml Eppendorfröhrchen gegeben. Anschließend wurde in jedes Röhrchen 5µl eines Primers (5pmol/µl) dazugegeben. Daraus ergab sich für die Sequenzierung einer FSME-Virus positiven Probe folgendes Schema (Tabelle 24).

Tabelle 24: Versandschema pro Probe. Es wurden pro Probe drei 1,5ml Eppendorfgefäße versand.

| Tube Nr. | Menge Amplifikat in µl | Primer (5pmol/µl) | Menge in µl |
|----------|------------------------|-------------------|-------------|
| 1 | 5 | 885 | 5 |
| 2 | 5 | 1648 | 5 |
| 3 | 5 | 2571c | 5 |

Die Zuordnung der Proben erfolgte über Barcodes, die auf die Gefäße geklebt wurden. Die Ergebnisse konnten im Laufe des Vormittags des übernächsten Werktages online abgerufen werden.

2.2.4.6. Datenbankrecherche und phylogenetische Charakterisierung

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Lite Korrektur gelesen. Die einzelnen Sequenzen wurden anschließend mittels des Programms BioEdit zu einem Alignment zusammengefasst und in das Fasta-Format umgewandelt. Anschließend wurden diese Daten mit Sequenzen der Gendatenbank Genbank verglichen. Die Erstellung der Stammbäume zur phylogenetischen Einordnung der FSME-Stämme wurde mit dem Programm MEGA Version 5.2.2 durchgeführt.

2.3. Verwendete Materialien und Geräte

2.3.1. Allgemeines und Zeckenfang

| | | |
|--|-------------------------------------|------|
| Einweg-Handschuhe (Latex, Nitril) | Reaktionsgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml) | Safe |
| Einweg-Handschuhe (Neopren) | Lock Tubes, | |
| Einweg-Pipettenspitzen, gestopft Premium | Wasser (PCR clean) | |
| Tips, | Zeckenfahne | |
| Eppendorf Reference (0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl) Pipette | | |
| Falcon™ Tubes (15ml & 50ml) | | |
| PCR-Gefäße (0,2ml) | | |
| Petrischalen | | |
| Pinzette | | |

Inhaltsverzeichnis

Asid Bonz

Ansell

Biozym

Eppendorf

BD Biosciences

Biozym

Greiner Bio-one GmbH

Eppendorf

Promega

selbst gebaut

2.3.2. Homogenisieren der Zecken

Eppendorf Multipette 4780

Multi-Tip Pipettenspitzen (10ml) Combitips advanced

Stahlkugeln Martin (3mm Durchmesser)

Zellkulturmedium (MEM Earle (1x) w2,2g/l NaHCO₃, w stable glutamine) mit 0,1% Gentamycin mit 1g/l Streptomycin

Eppendorf

Eppendorf

VWR

Biochrom AG

2.3.3. Nukleinsäureextraktion

96well Platte

Mehrkanalpipette (50-1200µl)

NucliSens® easyMag™ Disposables

NucliSens® easyMag™ Extraction Buffer 1, 2, 3

NucliSens® easyMag™ Lysis Buffer

NucliSens® easyMag™ Magnetic Silica

Pipettenspitzen, gestopft (50-1200µl)

Recombinant RNAsin®

Greiner Bio-one GmbH

Biohit

BioMérieux

BioMérieux

BioMérieux

BioMérieux

Biohit

Promega

2.3.4. PCR

Glaskapillaren (20µl)

Kälteblock mit Centrifuge Adapters

| | |
|---|--------------------------------|
| LightCycler® RNA Master HybProbe | Roche |
| Primer | Roche |
| Sonden | Roche |
| SuperScript III One-Step RT-PCR Kit with Platinum® Taq High Fidelity | TibMol TibMol Invitrogen |

2.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

| | |
|--|------------------------------|
| 100bp Ladder | Pharmacia |
| Ethidiumbromid (1%) | Merck |
| Ladepuffer | |
| 4g Ficoll | Sigma |
| 0,05g Bromphenolblau | Merck |
| 20ml H ₂ O | Promega |
| peq Gold Universal Agarose | Peqlab |
| TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer) | 3l H ₂ O Merck |
| 161,7g Tris | Merck |
| 85,5g Borsäure | Merck |
| 60ml 0,5M EDTA | Promega |

2.13.6. Zellkultur

| | |
|--|---------------------------------------|
| Serologische Pipette, steril (5ml, 10ml, 25ml) | Greiner Bio-one GmbH |
| Akkubetriebene Pipettierhilfe (Pipetus) | |
| Trypsin (0.25% (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺) | Hirschmann Laborgeräte |
| Fetales Kälberserum | Biochrom AG |
| MEM Vitamine 100x | Gibco |
| PBS 10x | Gibco |
| Formaldehyd | Biochrom AG |
| Kristallviolett | VWR |
| Methylzellulose | MERCK |
| Cellstar [®] Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 175cm ²) | Sigma-Aldrich Greiner Bio-one GmbH |

2.3.7. Geräte

| | |
|---|---|
| Elektrophorese-Kammer | Biorad |
| GeneAmp [®] PCR System 9700 | Applied Biosystems |
| Geldokumentationssystem | Bioprofil [®] , LTF Labortechnik |
| Kugelmühle MM400 | Retsch |
| Kühlzentrifugen 5810R und 5415R und 5402 | Eppendorf |
| LightCycler [®] 2.0 | |
| LightCycler [®] 1.5 | Roche |
| Minizentrifuge 5415D | Roche |
| NucliSens [®] easyMag [™] | Eppendorf |
| Rüttler Reax2000 | BioMérieux Heidolph |

2.3.7. Computerprogramme

BioEdit, Version 7.2.0

<http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

MEGA, Version 5.2.2

<http://megasoftware.net/>

Chromas Lite, Version 2.6.1

<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>

3. Ergebnisse

3.1. Zeckenfang und -bestimmung

3.1.1. Zeckenfang

Alle Zecken der vorliegenden Arbeit wurden mittels der Flaggmethode gefangen. Dabei wird ein Moltontuch, welches an einem T-Stück befestigt ist über die Vegetation gezogen und die daran hängenden Zecken mit einer Pinzette abgesammelt. Tabelle 25 und Tabelle 26 zeigen die Anzahl der Zecken, die an den untersuchten Standorten Emmendingen Neumattengraben (EN), Lauterbach (La), Lorettohof (Lh) und Stuttgart Botnang (SB) in den Jahre 2014 bis 2016 eingesammelt wurden. Die größte Anzahl an Zecken (9732 Individuen) wurde am Standort Emmendingen Neumattengraben geflaggt und die geringste am Standort Lorettohof (407 Individuen). Der Standort Stuttgart Botnang wurde im Jahr 2015 im Rahmen einer Masterarbeit (Drehmann, 2016) auf Zecken untersucht. Da nur Nymphen und adulte Zecken auf FSME-Viren untersucht wurden, werden die gefundenen Larven nicht aufgeführt.

Tabelle 25: Anzahl geflaggter Zecken der untersuchten Standorte in den Jahren 2014-2016. Daten für SB aus 2015 stammen aus (Drehmann, 2016) Zahlen in Klammern stellen den im Jahr 2016 Anteil der Zecken des Standortes Lorettohof dar, die aus dem Bereich mit nachgewiesenen FSME-Viren stammen. Abkürzungen: N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang

| | 2014 | | | 2015 | | | 2016 | | | Gesamt |
|----|------|-----|-----|------|-----|-----|-----------|--------|---------|--------|
| | N | W | M | N | W | M | N | W | M | |
| La | 745 | 265 | 140 | 849 | 351 | 204 | - | - | - | 2554 |
| Lh | - | - | - | - | - | - | 237 (200) | 81(59) | 89 (59) | 407 |
| SB | - | - | - | 480 | 38 | 15 | 1392 | 398 | 467 | 2790 |

Die Darstellung der am Standort Emmendingen Neumattengraben geflaggten Zecken erfolgt unterteilt nach beflaggten Bereichen. Dabei wurden im Jahr 2015 deutlich mehr Zecken geflaggt als im Jahr 2014.

Tabelle 26: Anzahl geflaggter Zecken der verschiedenen Teile des Standortes Emmendingen Neumattengraben der Jahre 2014-2016. Zahlen in Klammern stellen den im Jahr 2016 molekularbiologisch auf FSME-Viren untersuchten Anteil der Zecken des Standortes Emmendingen Neumattengraben dar.

| | 2014 | | | 2015 | | | 2016 | | | Gesamt |
|---|------|-----|----|------|-----|-----|-----------|----------|----------|------------|
| | N | W | M | N | W | M | N | W | M | |
| A | 187 | 15 | 52 | - | - | - | - | - | - | 254 |
| B | 388 | 98 | 75 | 1531 | 207 | 319 | - | - | - | 2618 |
| C | 416 | 101 | 82 | 1132 | 355 | 402 | - | - | - | 2488 |
| D | 243 | 4 | 66 | - | - | - | - | - | - | 313 |
| a | - | - | - | - | - | - | 702 (120) | 156 (20) | 127 (50) | 985 (190) |
| b | - | - | - | - | - | - | 942 (150) | 115 (35) | 176 (25) | 1233 (210) |
| c | - | - | - | - | - | - | 1227 (90) | 331 (70) | 283 (30) | 1841 (190) |

Dabei zeigt sich deutlich, dass an allen untersuchten Standorten deutlich mehr Nymphen als adulte Zecken gefangen wurden. Je nach Standort und Jahr machen dabei die Nymphen zwischen etwa 60% (La, 2015) und 90% (SB, 2015) aus.

3.1.2. Zeckenbestimmung

Sämtliche geflaggte Zecken wurden mittels Arthur, 1963, Hillyard, 1996 und Manilla, 1998 unter einer Stereolupe morphologisch bis zur Art bestimmt. Tabelle 27 und Tabelle 28 zeigen die Ergebnisse der Artbestimmung der geflaggte Zecken nach Jahren und Stadium.

Tabelle 27: Ergebnisse der Artbestimmung geflaggter Zecken an den Untersuchungsstandorten des Jahres 2014 nach Stadium getrennt. Abkürzungen: L: Larve, N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, EN: Emmendingen Neumattengraben, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang. I.a.: *Ixodes acuminatus*, I.r.: *Ixodes ricinus*, I.h.: *Ixodes hexagonus*, I.f.: *Ixodes frontalis*, D.r.: *Dermacentor reticulatus*

| Standort | Art | 2014 | | | |
|----------|------|------|------|-----|-----|
| | | L | N | M | W |
| EN | I.r. | 117 | 1234 | 218 | 275 |
| | I.a. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | I.h. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | D.r. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| La | I.r. | 28 | 741 | 265 | 140 |
| | I.a. | 0 | 4 | 0 | 0 |
| Lh | I.r. | - | - | - | - |
| SB | I.f. | - | - | - | - |
| | I.r. | - | - | - | - |

Tabelle 28: Ergebnisse der Artbestimmung geflaggter Zecken an den Untersuchungsstandorten der Jahre 2015 und 2016 nach Stadium getrennt. Die Daten des Jahres 2015 des Standortes SB stammen aus (Drehmann, 2016). Abkürzungen: L: Larve, N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, EN: Emmendingen Neumattengraben, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang. I.a.: *Ixodes acuminatus*, I.r.: *Ixodes ricinus*, I.h.: *Ixodes hexagonus*, I.f.: *Ixodes frontalis*, D.r.: *Dermacentor reticulatus*

| Standort | Art | 2015 | | | | 2016 | | | |
|----------|------|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|
| | | L | N | M | W | L | N | M | W |
| EN | I.r. | 241 | 2660 | 559 | 719 | 438 | 2865 | 594 | 582 |
| | I.a. | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| | I.h. | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| | D.r. | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| La | I.r. | 32 | 849 | 351 | 204 | - | - | - | - |
| | I.a. | 0 | 8 | 0 | 0 | - | - | - | - |
| Lh | I.r. | - | - | - | - | 0 | 237 | 81 | 89 |
| SB | I.f. | 873 | 5 | 0 | 1 | 181 | 2 | 0 | 0 |
| | I.r. | 954 | 480 | 15 | 38 | 219 | 1390 | 467 | 398 |

Den Hauptteil stellt *I. ricinus* dar. Auch *I. frontalis* war am Standort Stuttgart Botnang häufiger zu finden. Allerdings konnten auch die Arten *D. reticulatus*, *I. acuminatus*, *I. hexagonus* in geringer Zahl an den Standorten Lauterbach und Emmendingen nachgewiesen werden.

3.2. Nagerfang

Alle Nagetiere, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stammen von dem Standort Stuttgart Botnang und wurden dort mittels Totschlagfallen von den Gartenbesitzern gefangen. Das Fangen der Nagetiere erfolgte durchgängig von Januar 2015 bis Dezember 2016 einschließlich. Tabelle 29 zeigt dabei die in Stuttgart Botnang gefangenen Nagetiere unterteilt nach Art und Jahr.

Tabelle 29: Anzahl und Art gefangener Nagetiere am Standort Stuttgart Botnang der Jahre 2015 und 2016.

| Tierart | 2015 | 2016 | Gesamt |
|-----------------------|------|------|--------|
| <i>A. sylvaticus</i> | 3 | 0 | 3 |
| <i>A. flavicollis</i> | 11 | 7 | 18 |
| <i>M. glareolus</i> | 80 | 25 | 105 |
| <i>R. norvegicus</i> | 1 | 0 | 1 |
| Gesamt | 95 | 32 | 127 |

Anhand der Daten ist deutlich zu erkennen, dass hauptsächlich Tiere der Arten *M. glareolus* und *A. flavicollis* gefangen wurden. Von insgesamt 127 gefangenen Tieren entfallen 123 (97%) auf diese beiden Arten. Bemerkenswert ist außerdem, dass im Jahr 2015 mehr als dreimal so viele Nagetiere gefangen wurden. Die beiden Arten *A. sylvaticus* und *R. norvegicus* sind als Beifänge zu betrachten.

3.2. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren

Der molekularbiologische Nachweis von FSME-Viren in Zecken wurde mittels einer reversen Transkriptase real-time PCR durchgeführt (Schwaiger, et al., 2003). Dabei wird ein 68bp langer, FSME-Virus spezifischer Teil der 3' nicht kodierenden Region der Virus RNA amplifiziert.

3.2.1. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Zecken

Insgesamt wurden auf diese Weise 13308 Zecken gepoolt untersucht. Dabei konnten in zehn Poolproben FSME-Viren nachgewiesen werden. Sieben dieser Pools stammen vom Standort Emmendingen Neumattengraben, einer vom Standort Lorettohof und zwei von dem Standort Stuttgart Botnang. Die Zecken der FSME-positiv getesteten Pools wurden einzeln aufgereinigt und mit der gleichen Methode auf FSME-Viren untersucht. Dabei zeigte sich, dass je Pool eine Zecke FSME-positiv war. Tabelle 30 zeigt die positiv getesteten Zecken unterteilt nach Standort, Teilbereich und Jahr. Abbildung 25 und Abbildung 26 zeigen die Unterteilung des Standortes Emmendingen Neumattengraben in Teilbereiche.

Tabelle 30: Zeigt die positiv auf FSME-Viren getesteten Zeckenproben nach Standort Jahr und Zeckenstadium getrennt. *: Teilbereich B, **: Teilbereich C, ^a: Teilbereich a, ^b: Teilbereich b, ^c: Teilbereich c.

| Standort | Jahr | Zeckenstadium | Zeckenart |
|-----------------------------|------|------------------------|-------------------|
| Emmendingen Neumattengraben | 2014 | Nymphe [*] | <i>I. ricinus</i> |
| | 2014 | Weibchen ^{**} | <i>I. ricinus</i> |
| | 2015 | Weibchen [*] | <i>I. ricinus</i> |
| | 2015 | Nymphe ^{**} | <i>I. ricinus</i> |
| | 2016 | Weibchen ^a | <i>I. ricinus</i> |
| | 2016 | Männchen ^b | <i>I. ricinus</i> |
| | 2016 | Nymphe ^c | <i>I. ricinus</i> |
| Lorettohof | 2016 | Weibchen | <i>I. ricinus</i> |
| Stuttgart Botnang | 2016 | Nymphe | <i>I. ricinus</i> |
| | 2016 | Nymphe | <i>I. ricinus</i> |

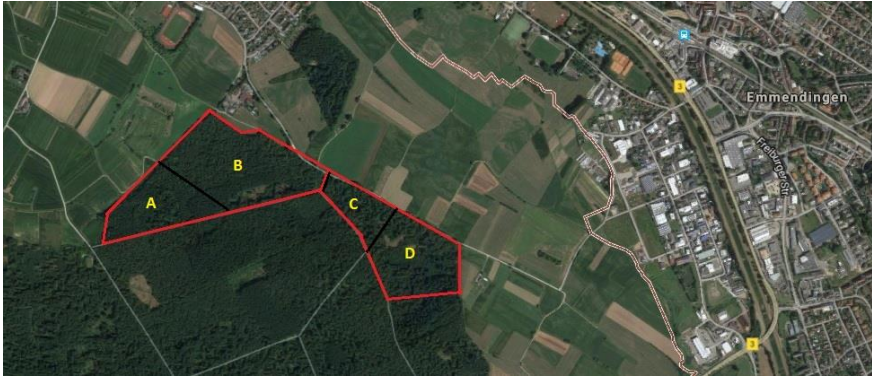


Abbildung 25: Zeigt die Unterteilung des Standorts Emmendingen Neumattengraben in Teilbereiche A, B, C und D



Abbildung 26: Zeigt den Standorte Emmendingen Neumattengraben mit der Unterteilung des Grenzgebiets der Teilbereiche B und C in a, b und c.

Dabei ergaben sich am Standort Emmendingen Prävalenzen von 0,12% (2014) in den Gebieten A+B+C+D, 0,0051% (2015) in den Gebieten B+C und 0,51% (2016) in den Gebieten a+b+c.

Der Standort Lorettohof wurde ausschließlich im Jahr 2016 im Rahmen der alimentären FSME-Fälle auf Zecken untersucht. Insgesamt wurden 407 Zecken eingesammelt und analysiert. Dabei wurde ein Pool aus zwei Weibchen positiv auf FSME-Viren getestet. Der Nachtest des Einzelhomogenate zeigte, dass eines der beiden Weibchen FSME-positiv war. Es ergibt sich somit eine Prävalenz von 0,24% im Jahr 2016.

Am Standort Lauterbach wurden in den Jahren 2014 und 2015 insgesamt 2554 Zecken geflaggt und auf FSME-Viren untersucht. Dabei konnten in keiner Zecke FSME-Viren nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen am Standort Stuttgart Botnang wurden im Jahr 2015 im Rahmen der Masterarbeit (Drehmann, 2016) durchgeführt. Dabei wurden 533 Zecken auf FSME-Viren untersucht, wobei alle negativ waren. Im folgenden Jahr wurden 2257 Zecken untersucht und dabei aus zwei Exemplaren ein FSME-Isolat gewonnen. Daraus ergibt sich eine Prävalenz von 0,009% am Standort Stuttgart Botnang im Jahr 2016.

3.2.2. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Organproben von Nagetieren

Es wurden insgesamt 245 Organproben von 123 Nagetieren des Standortes Stuttgart Botnang untersucht. Tabelle 31 zeigt die Anzahl untersuchter Organproben nach Jahr, Nagetierart und Verfügbarkeit. Dabei ist zu berücksichtigen, dass im Jahr 2015 nur 79 Gehirnproben von Rötelmäusen untersucht wurden. Eine der Mäuse war von der Falle am Kopf getroffen worden, sodass eine Probenentnahme nicht mehr möglich war. In keinem der untersuchten Organe waren FSME-Viren nachweisbar.

Tabelle 31: Anzahl untersuchter Organproben nach Jahr Nagetierart und Verfügbarkeit. *: Eine Probe des Gehirns konnte nicht genommen werden.

| Jahr | Nagetierart | Organproben | |
|------|-----------------------|-------------|--------|
| | | Milz | Gehirn |
| 2015 | <i>A. sylvaticus</i> | 3 | 3 |
| | <i>A. flavicollis</i> | 11 | 11 |
| | <i>M. glareolus</i> | 80 | 79* |
| | <i>R. norvegicus</i> | 1 | 1 |
| 2016 | <i>A. flavicollis</i> | 7 | 7 |
| | <i>M. glareolus</i> | 25 | 25 |
| | | | |

3.2.3. Molekularbiologischer Erregernachweis von FSME-Viren in Milchprodukten

Insgesamt wurden 23 Rohmilchprodukte des Ziegenhofs Loretto aus der Nähe von Zwiefalten auf FSME-Viren untersucht. Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, da sich in diesem Zeitraum vermutlich zwei Personen durch den Verzehr von Rohmilch und/oder Rohmilchprodukten auf diesem Hof mit FSME-Viren infiziert hatten. Davon wurden ein Frischkäse, ein Schnittkäse, sowie je 2 Weichkäse (gereift und jung) positiv auf FSME-Viren getestet. Die gemessenen Ct-Werte während der qrt-PCR waren deutlich höher als die des Nachweises aus Zeckenhomogenaten. Sie lagen im Bereich zwischen 35,8 und 38,7. Tabelle 32 zeigt die Aufteilung der 23 Proben auf unterschiedliche Milchprodukte, sowie die Anzahl der jeweils positiv getesteten Einzelprodukte.

Tabelle 32: Anzahl untersuchter Proben nach Produktart sowie Anzahl positiv getesteter Proben¹: davon einer mit Curry, ²: ohne Curryzusatz

| Probenmaterial | Probenanzahl | FSME-positiv |
|-------------------|----------------|----------------|
| Frischkäse | 2 ¹ | 1 ² |
| Rohmilch | 1 | 0 |
| Schnittkäse | 2 | 1 |
| Weichkäse gereift | 13 | 2 |
| Weichkäse jung | 5 | 2 |

Während des Anzuchtversuchs der Proben in der Zellkultur (siehe 3.3.1. Anzucht von FSME-Viren in der Zellkultur) wurde erkannt, dass nicht jede aus dem Käse genommene Probe nachweisbare FSME-Viren enthielt. Daher wurden von jedem Käse zehn Proben aus unterschiedlichen Bereichen des Gesamtmaterials untersucht. Die Anzahl der positiven Einzelproben pro Käse sind in Tabelle 33 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass nur 26,7% aller untersuchten Proben ein positives Ergebnis in der PCR erbrachten.

Tabelle 33: Auswahl der untersuchten Milchprodukte. Dargestellt sind die Proben, die mittels PCR positiv auf FSME-Viren getestet wurden, sowie die Anzahl positiver Einzeluntersuchungen.

| Probenmaterial | Anzahl PCR-positiver Proben |
|---------------------|-----------------------------|
| Frischkäse 1 | 3 |
| Schnittkäse 1 | 2 |
| Weichkäse gereift 1 | 2 |
| Weichkäse gereift 2 | 2 |
| Weichkäse jung 1 | 3 |
| Weichkäse jung 2 | 4 |

Zehn zufällig ausgewählten Proben wurde FSME-Virusmaterial zugesetzt. Im Rahmen dieses Spike-Experiments wurde, zusätzlich zu dem Probenmaterial die gleiche Menge Positivkontrollmaterial in der PCR-Untersuchung eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Kombination des Probenmaterials keinerlei Einfluss auf das PCR-Ergebnis hatte. Die gespikten Proben wurden mit demselben Ct-Wert detektiert wie auch die Positivkontrolle.

3.3. Molekularbiologisch Charakterisierung und phylogenetische Einordnung der FSME-Viren

In dieser Arbeit wurden die hier nachgewiesenen FSME-Virusstämme molekularbiologisch charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet. Zu diesem Zweck wurde das E-Gen der Viren sequenziert). Es eignet sich besonders gut für diesen Zweck, da es hoch konserviert ist und bereits kleine Veränderungen die Infektiosität und somit die Vermehrung des Virus stark beeinflussen können.

3.3.1. Anzucht von FSME-Viren in der Zellkultur

Es wurden alle in dieser Arbeit nachgewiesenen FSME-Virusstämme in Zellkulturen gegeben um das Ausgangsmaterial zu vermehren und so eine ausreichend große Menge für die Charakterisierung zur Verfügung zu haben. Zu diesem Zweck wurden die Viren in PS-Zellen und A549-Zellen in bis zu fünf Passagen vermehrt. Dabei wurde spätestens nach einer Woche passagiert. Die Zellkulturüberstände der Anzuchtversuche aus Milchprodukten wurden nach der ersten Passage sterilfiltriert um einen nicht durch FSME-Viren hervorgerufenen CPE zu verhindern. So wurden neun der zehn Stämme aus Zeckenhomogenaten und zwei von sechs Stämmen aus Milchprodukten angezüchtet und vermehrt. Tabelle 34 zeigt alle FSME positiv getesteten Proben sowie deren Herkunft, Ausgangsmaterial, Anzuchtergebnis und die Anzahl benötigter Passagen und die Änderung des Ct-Werts in der qrt-PCR durch die Anzucht. Während jeder Passage wurde die Kultur mikroskopisch bewertet und abschließend die Virus-RNA mittels qrt-PCR (Schwaiger, et al., 2003) nachgewiesen. Um sicher zu stellen, dass das Anzuchtmaterial aus dem Käse auch FSME-Viren enthielt wurden jeweils 3 Stücke aus unterschiedlichen Bereichen wie in 3.2.3. dargestellt auf FSME-Viren untersucht und das Homogenat, welches den niedrigsten Ct-Wert in der qrt-PCR aufwies für den Anzuchtversuch verwendet.

Tabelle 34: Übersicht aller FSME-positiven Proben, deren Anzuchtergebnis, sowie der Änderung des Ct-Werts in der qrt-PCR.

| Probename | Herkunft | Ausgangsmaterial | Anzucht | Passagen | Ct-Wert-änderung |
|-----------|-------------------|--------------------|---------|----------|------------------|
| EN N 1044 | Emmendingen | Nymphe | Ja | 2 | -7,3 |
| EN W 149 | Emmendingen | Weibchen | Ja | 1 | -6,9 |
| EN W 456 | Emmendingen | Weibchen | Ja | 1 | -7,1 |
| EN N 2711 | Emmendingen | Nymphe | Ja | 1 | -7,4 |
| EN W 53 | Emmendingen | Weibchen | Ja | 2 | -6,9 |
| EN M 226 | Emmendingen | Männchen | Ja | 3 | -6,7 |
| EN N 393 | Emmendingen | Nymphe | Ja | 1 | -9,7 |
| Lh W 89 | Loretthof | Weibchen | Nein | - | - |
| SB N 478 | Stuttgart Botnang | Nymphe | Ja | 1 | -5,5 |
| SB N 818 | Stuttgart Botnang | Nymphe | Ja | 1 | -4,8 |
| K2 | Loretthof | Weichkäse, jung | Nein | - | - |
| K5 | Loretthof | Weichkäse, jung | Ja | 5 | -2,2 |
| K10 | Loretthof | Weichkäse, gereift | Nein | - | - |
| K12 | Loretthof | Schnittkäse | Nein | - | - |
| K13 | Loretthof | Frischkäse | Nein | - | - |
| K-RT-2 | Loretthof | Weichkäse gereift | Nein | - | - |

3.3.2. Amplifikation und Sequenzierung des E-Gens von FSME-Viren zur molekularbiologischen Charakterisierung und phylogenetischen Einordnung

Um die FSME-Virusstämme molekularbiologisch charakterisieren und phylogenetisch einordnen zu können wurde das E-Gen, sowie die umgebenden Bereiche in einer One-Step-RT-PCR amplifiziert. Dies gelang bei allen Stämmen, die aus Zeckenmaterial isoliert wurden, sowie bei zwei der sechs Stämme aus Milchprodukten. Abbildung 27 zeigt exemplarisch die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte zweier FSME-Virusstämme. Die jedes Mal mitgeführten Positiv- und Negativkontrollen waren immer einwandfrei interpretierbar.

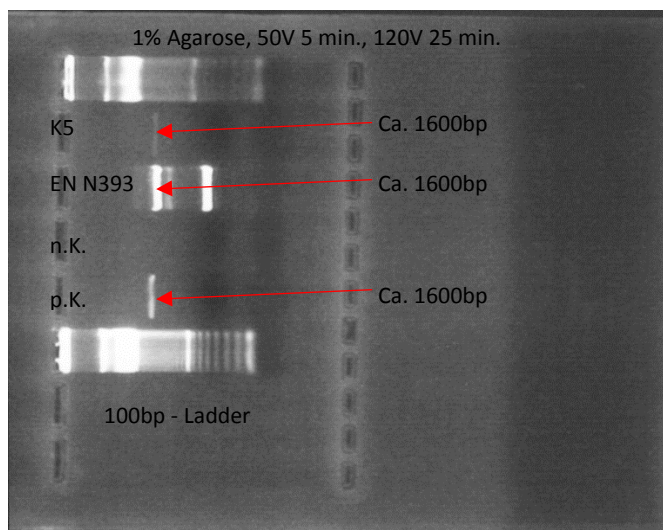


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese nach erfolgreicher Amplifikation des E-Gens zweier Virusstämme. n.K.: negative Kontrolle, p.K. positive Kontrolle

Erfolgreich amplifizierte PCR-Produkte wurden mit dem Qiaquick-Kit der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt und in drei Ansätzen durch die Firma GATC sequenziert. Dabei war es nötig ausreichend

lange Sequenzen zu erhalten, um diese zu einer Gesamtsequenz zusammensetzen zu können. Abbildung 28 zeigt schematisch die Zusammensetzung dieser Gesamtsequenz aus drei Teilsequenzen.

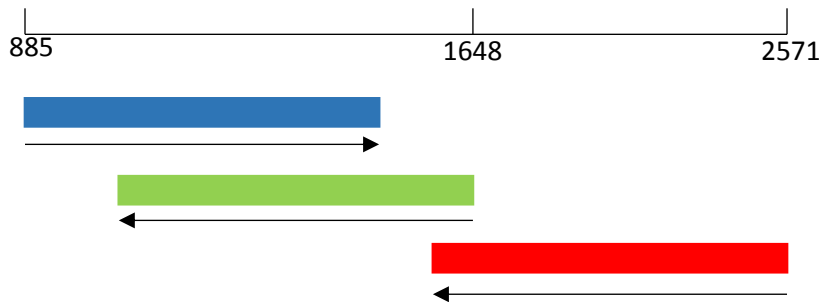


Abbildung 28: Zusammensetzung der Sequenz des E-Gens aus drei Teilsequenzen

Die Bildung einer Gesamtsequenz war in neun von zehn Fällen möglich. Lediglich eine Probe (EN M 226) aus Emmendingen konnte nicht komplett zusammengesetzt werden, da hier 11 Basen zwischen dem zweiten und dritten Teilstück nicht präzise genug ausgewertet werden konnten. Ein Vergleich der 3 Teilstücke mit den anderen Sequenzen aus Emmendingen ergab allerdings eine 100% Übereinstimmung mit der Sequenz der Probe EN N 393 in den vorhandenen Bereichen. Beide Sequenzen stammen von Zecken aus dem Jahr 2016. Die vollständigen Sequenzen wurden mit bereits untersuchten Stämmen aus Emmendingen (Lindau, 2013) paarweise verglichen. Tabelle 35 und Tabelle 36 zeigen die Ergebnisse dieser Vergleiche. Dabei fällt auf, dass sich die verschiedenen Stämme eines Standorts sehr stark ähneln jedoch fast nie identisch sind. Die Unterschiede liegen bei maximal 4 Nukleotiden bzw. 2 Aminosäureänderungen beim Vergleich zwischen z.B. W53 und N2711.

Tabelle 35: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate vom Standort Emmendingen. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Nukleotidaustauschen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 1488bp lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Nukleotiden, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. nt: Nukleotide (Material für Stämme N857 und N858: (Lindau, 2013))

| Stamm | N 857 | N858 | N 1044 | W 149 | W 456 | N 2711 | W53 | N393 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| N 857 | | 0 nt | 1 nt | 2 nt | 0 nt | 1 nt | 2 nt | 2 nt |
| N 858 | 0,0000 | | 1 nt | 2 nt | 0 nt | 1 nt | 2 nt | 2 nt |
| N 1044 | 0,0006 | 0,0006 | | 3 nt | 1 nt | 2 nt | 3 nt | 3 nt |
| W 149 | 0,0012 | 0,0012 | 0,0019 | | 2 nt | 3 nt | 4 nt | 4 nt |
| W 456 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0006 | 0,0012 | | 1 nt | 2 nt | 2 nt |
| N 2711 | 0,0006 | 0,0006 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0006 | | 3 nt | 3 nt |
| W 53 | 0,0012 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0025 | 0,0012 | 0,0019 | | 4 nt |
| N 393 | 0,0012 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0025 | 0,0012 | 0,0019 | 0,0025 | |

Inhaltsverzeichnis

Tabelle 36: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate vom Standort Emmendingen. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Aminosäureänderungen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 496 Aminosäuren lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Aminosäuren, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. aa: Aminosäuren (Material für Stämme N857 und 858: (Lindau, 2013))

| Stamm | N 857 | N858 | N 1044 | W 149 | W 456 | N 2711 | W53 | N393 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------|
| N 857 | | 0 aa | 0 aa | 0 aa | 0 aa | 1 aa | 1 aa | 0 aa |
| N 858 | 0,0000 | | 0 aa | 0 aa | 0 aa | 1 aa | 1 aa | 0 aa |
| N 1044 | 0,0000 | 0,0000 | | 0 aa | 1 nt | 1 aa | 1 aa | 0 aa |
| W 149 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | | 1 aa | 1 aa | 1 aa | 0 aa |
| W 456 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | | 1 aa | 1 aa | 0 aa |
| N 2711 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | | 2 aa | 1 aa |
| W 53 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0020 | 0,0040 | | 1 aa |
| N 393 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0020 | 0,0020 | |

Ein Vergleich dieser Sequenzen mit den Daten der Gendatenbank (Genbank) (Abruf:12.04.2017) zeigte, dass die Stämme aus Emmendingen die größte Übereinstimmung mit den in Tabelle 37 genannten Stämmen haben. Die Unterschiede waren dabei mit bis zu 51 Nukleotiden bzw. 38 Aminosäuren deutlich größer. Der Stamm Joutseno stammt aus Finnland (Utzcátegui, et al., 2012), der Stamm CGI 223 aus der Slowakei (Frey, et al., 2014).

Tabelle 37: Zeigt die Unterschiede zwischen dem ersten in Emmendingen isolierten Stamm N857 und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank). nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren

| Stamname | accession no. | Unterschiede zu N857 | Unterschiede zu N857 |
|----------|---------------|----------------------|----------------------|
| Joutseno | GU183381.1 | 50 nt | 33 aa |
| CGI 223 | KC835597.1 | 51 nt | 38 aa |

Die Isolate aus Stuttgart Botnang unterscheiden sich ähnlich wenig wie die aus Emmendingen, in nur zwei Nukleotiden voneinander, sind aber in Bezug auf die Aminosäuresequenz identisch. Tabelle 38 zeigt die Stämme mit der größten Übereinstimmung zu denen aus Stuttgart Botnang, die aus der Gendatenbank (Genbank) (Abruf: 12.04.2017) stammen. Auch hierbei fällt der Unterschied zu den Sequenzen mit 15 Nukleotiden bzw. sieben Aminosäureänderungen größer aus als innerhalb des Standortes. Die Stämme 9001 und 9025 stammen beide aus der mittelböhmischen Region in Tschechien (Weidmann, et al., 2011).

Tabelle 38: Zeigt die Unterschiede zwischen den in Botnang isolierten Stämmen und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank). nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren

| Stamname | accession no. | Unterschiede zu N478 | Unterschiede zu N478 |
|------------|---------------|----------------------|----------------------|
| Stamm 9001 | JF501407.1 | 15 nt | 7 aa |
| Stamm 9025 | JF501408.1 | 15 nt | 7 aa |

Das Isolat aus dem Ziegenkäse (K5) unterschied sich von dem am selben Standort aus einer Zecke isoliertem Stamm LH W89 in zwei Nukleotiden, die zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz führen. Ein Vergleich mit der Gendatenbank (Genbank) (Abruf:12.04.2017) zeigt die größte Übereinstimmung dieser Isolate mit den in Tabelle 39 dargestellten Stämmen. Dabei zeigen sich Unterschiede in elf bis 13 Nukleotiden, die allerdings zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz führen.

Tabelle 39: Zeigt die Unterschiede zwischen dem Isolat aus Ziegenkäse, sowie der Zecke vom Standort Lorettohof und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank) . nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren

| Stammname | accession no. | Unterschiede zu K5 | Unterschiede zu K5 |
|------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Dagmarsellen 1 | HM468142.1 | 13 nt | 0 aa |
| Brittnau 4 | HM468126.1 | 13 nt | 0 aa |
| Zofingen2 | HM468130.1 | 11 nt | 0 aa |

Ein Vergleich der aus Emmendingen, Stuttgart Botnang und dem Gebiet des Lorettohofs isolierten Stämme zeigt, dass sich die Sequenzen aus Emmendingen in 62 bis 64 Nukleotiden von den Isolaten aus Stuttgart Botnang unterscheiden. Dabei sind der Sequenzunterschied zwischen Emmendingen und dem Lorettohof mit 49 bis 52 Nukleotiden etwas geringer. Die Isolate aus Stuttgart Botnang und dem Lorettohof differieren in 51 Nukleotide.

Inhaltsverzeichnis

Tabelle 40: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate aller untersuchten Standorte. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Nukleotidaustauschen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 1488bp lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Nukleotiden, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. nt: Nukleotide (Material für Stämme N857 und N858: (Lindau, 2013))

| | EN_N857 | EN_N858 | EN_N104 4 | EN_W149 | EN_W456 | EN_N271 1 | EN_W53 | EN_N393 | SB-H242 | SB-B185 | SB_N478 | SB_N818 | K_5 | LH_W_89 |
|--------------|---------|---------|--------------|---------|---------|--------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|
| EN_N857 | | 0 nt | 1 nt | 0nt | 0nt | 1nt | 2nt | 2nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 50nt |
| EN_N858 | 0,0000 | | 1nt | 1nt | 0nt | 1nt | 2nt | 2nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 50nt |
| EN_N104 4 | 0,0007 | 0,0007 | | 2nt | 1nt | 2nt | 3nt | 3nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 50nt |
| EN_W149 | 0,0007 | 0,0007 | 0,0015 | | 1nt | 2nt | 3nt | 3nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 50nt |
| EN_W456 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0007 | 0,0007 | | 1nt | 2nt | 2nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 50nt |
| EN_N271 1 | 0,0007 | 0,0007 | 0,0015 | 0,0015 | 0,0007 | | 3nt | 3nt | 62nt | 62nt | 62nt | 62nt | 50nt | 49nt |
| EN_W53 | 0,0015 | 0,0015 | 0,0022 | 0,0022 | 0,0015 | 0,0022 | | 4nt | 64nt | 64nt | 64nt | 64nt | 52nt | 52nt |
| EN_N393 | 0,0015 | 0,0015 | 0,0022 | 0,0022 | 0,0015 | 0,0022 | 0,0029 | | 64nt | 64nt | 64nt | 64nt | 52nt | 52nt |
| SB_H242 | 0,0456 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0464 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0472 | 0,0472 | | 0nt | 0nt | 0nt | 51nt | 51nt |
| SB_B185 | 0,0456 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0464 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0472 | 0,0472 | 0,0000 | | 0nt | 0nt | 51nt | 51nt |
| SB_N478 | 0,0456 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0464 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0472 | 0,0472 | 0,0000 | 0,0000 | | 0nt | 51nt | 51nt |
| SB_N818 | 0,0456 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0464 | 0,0456 | 0,0464 | 0,0472 | 0,0472 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | | 51nt | 51nt |
| K_5 | 0,0368 | 0,0368 | 0,0376 | 0,0376 | 0,0368 | 0,0376 | 0,0384 | 0,0384 | 0,0321 | 0,0321 | 0,0321 | 0,0321 | | 2nt |
| LH_W_89 | 0,0368 | 0,0368 | 0,0376 | 0,0376 | 0,0368 | 0,0376 | 0,0384 | 0,0384 | 0,0321 | 0,0321 | 0,0321 | 0,0321 | 0,0015 | |

3.3.3. Phylogenetische Einordnung der FSME-Viren

Die an den Standorten Emmendingen, Lorettohof und Stuttgart Botnang identifizierten FSME Stämme wurden phylogenetisch charakterisiert und dann mit FSME Isolaten aus der Genbank verglichen. Zu diesem Zweck wurden außerdem Sequenzen verschiedener FSME-Virusstämmen des europäischen, sibirischen und des fernöstlichen Subtyps aus der Gendatenbank verwendet, um einen umfassenden Überblick über die isolierten Stämme zu erhalten. Zusätzlich wurde eine Sequenz des Hüllproteins des Louping Ill-virus und eine Sequenz des Omsk hämorrhagischen Fiebertivirus aus der Gendatenbank als Außengruppe verwendet, um die berechneten Stammbäume wurzeln zu können. Tabelle 41 zeigt die zusätzlich verwendeten Stämme sowie die dazugehörigen Zugriffsnummern. Diese Stämme wurden gewählt, da sie als Referenzstämmen der entsprechenden Subtypen angesehen werden können oder eine feinere Aufgliederung des europäischen Subtyps ermöglichen.

Tabelle 41: Zeigt die zusätzlich verwendeten Virusstämmen zur Stammbaumerstellung. Daten der Außengruppe um den Stammbaum wurzeln zu können. * Daten erhalten von PD Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München

| Zugehörigkeit | Virusstamm | accession no. |
|----------------------|------------------------------------|---------------|
| Außengruppe | Louping Ill | X86784.1 |
| | Omsk hämorrhagisches Fiebertivirus | AF482345 |
| Europäischer Subtyp | K23 | AF091010.1 |
| | Neudörfl | U27495.1 |
| | Hypr | X75286.1 |
| | A104 | KF151173.1 |
| | DZIF17 1328 Tuebingen | keine* |
| | TBEV 8641 | JF501406 |
| | TBEV Vaslaty | KJ922516 |
| Sibirischer Subtyp | Kolarovo | FJ968751.1 |
| | Zausaev | AF527415.1 |
| Fernöstlicher Subtyp | Sofjin | JX498940.1 |
| | Primorye | JQ825164.1 |

Die Berechnungen wurden mittels zweier verschiedener Verfahren durchgeführt und die Stammbäume mit jeweils 1000 Bootstraps erstellt. Das bedeutet, dass die Stammbäume 1000-mal zusätzlich berechnet wurden und dabei untersucht wurde, ob geringfügige Änderungen in den Sequenzen den Stammbaum anders aussehen lassen würden. So ist es möglich eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit für einzelne Kreuzungen zu treffen. Dabei gilt: Je höher ein Bootstrapwert ist, desto besser ist die Kreuzung durch die vorhandenen Sequenzen abgesichert. Allgemein werden Werte über 90 als sehr stark angesehen, während Werte unter 70 als recht unzuverlässig gelten können. Die verwendeten Sequenzen wurden mittels des Programms MEGA 6.2 auf die einheitliche Länge des E-Gens gekürzt und aligniert. Insgesamt standen so Sequenzen mit einer Länge von 1488 bp zur Verfügung. Eine Sequenzlänge von 1488 bp ist relativ lang, so dass sich gute Ergebnisse bei phylogenetischen Untersuchungen erzielen lassen, da einzelne Mutationen nicht so stark gewichtet werden wie bei kurzen Sequenzen. Des Weiteren können, bei sehr kurzen Sequenzen Nukleotidunterschiede, die zwischen den einzelnen Sequenzen bestehen nicht innerhalb des untersuchten Bereichs liegen. Dies verringert die Zuverlässigkeit der Stammbäume stark. Dabei wurden die beiden Verfahren Maximum Parsimony und Maximum-Likelihood verwendet.

3.3.3.1. Stammbaumerstellung mittels des Maximum Parsimony Verfahrens

Das Maximum Parsimony Verfahren untersucht Verwandtschaften nach dem Prinzip der maximalen Sparsamkeit. Dies bedeutet, dass eine Verwandtschaft als näher angesehen wird, je weniger

Inhaltsverzeichnis

evolutionäre Schritte dafür notwendig sind. Abbildung 29 und Abbildung 30 zeigen die durch das Maximum Parsimony Verfahren berechneten Stammbäume auf Basis der Aminosäure-, bzw. Nukleotidsequenz. Bei den Stammbäumen handelt es sich um die Konsensus-Stammbäume. Das bedeutet, dass die Kreuzungen so dargestellt werden, wie sie in den meisten Bootstrapwiederholungen berechnet wurden. Auffällig ist in beiden Stammbäumen der Bootstrapwert von 0 an der Kreuzung, an der sich der sibirische und der fernöstliche Subtyp abspalten.

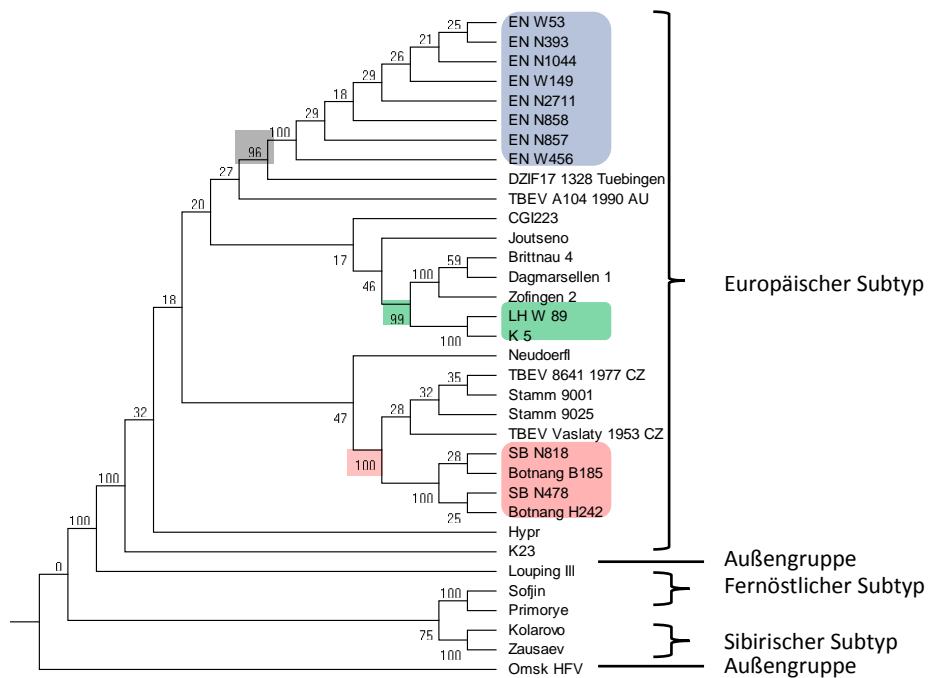


Abbildung 29: Maximum Parsimony Stammbaum auf Basis der Nukleotidsequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof.

Abbildung 29 zeigt, dass die drei verschiedenen Subtypen deutlich voneinander abgegrenzt sind und dieses auch durch einen hohen Bootstrapwert von 100 untermauert wird. Während sich der europäische Subtyp häufig als schwach unterstützt darstellt sind dennoch die Abtrennungen der verschiedenen Standorte in allen Fällen mit 96% bis 100% aller Berechnungen belegt.

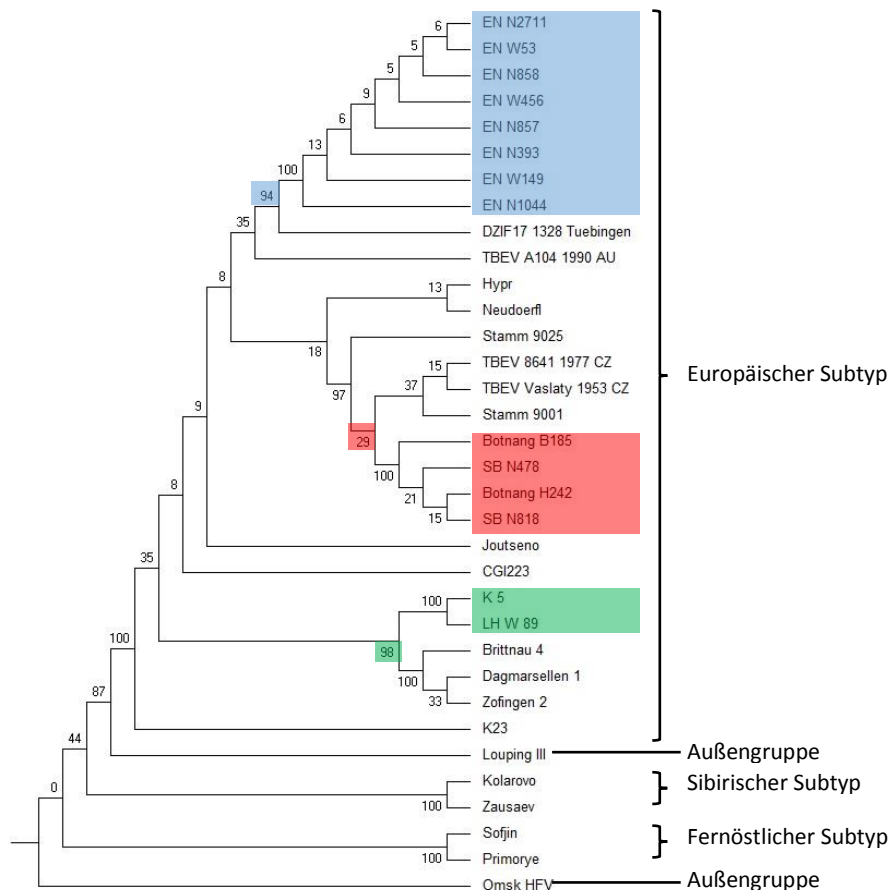


Abbildung 30: Maximum Parsimony Stammbaum auf Basis der Aminosäuresequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Loretthof

Im Stammbaum der Abbildung 30 ist die Auftrennung der FSME-Viren in die drei Subtypen ebenfalls deutlich zu erkennen. Auch die Abtrennung der Sequenzen vom Standort Emmendingen sind von den übrigen Sequenzen des europäischen Subtyps als eigene Klade mit einem Bootstrapwert von 94 berechnet. Die Stämme CGI223 und Joutseno aus der Gendatenbank sind separat geführt. Die Sequenzen der anderen beiden Standorte sind als einzelne Kladen zusammen mit ihren nächsten Verwandten aus der Gendatenbank zu erkennen. Bei den Sequenzen des Standorts Stuttgart Botnang fällt auf, dass sie nur mit einem Wert von 29 unterstützt werden. Auch bei diesem Stammbaum sind häufig nur niedrige Bootstrapwerte errechnet.

3.3.3.2. Stammbaumerstellung mittels des Maximum-Likelihood Verfahrens

Das Maximum-Likelihood Verfahren beruht auf der Wahrscheinlichkeitsschätzung für Punktmutationen anhand der vorhandenen Sequenzen. Es gilt als das Verfahren, das am wenigsten Anfällig für die Bildung von Berechnungsartefakten ist. Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen die Stammbäume, die mittels des Maximum-Likelihood Verfahrens anhand der Aminosäure-, bzw. Nukleotidsequenz der untersuchten Isolate, sowie den aus der Gendatenbank erhaltenen Sequenzen berechnet wurden. Bei den Stammbäumen handelt es sich um die Konsensus-Stammbäume. Das bedeutet, dass die Kreuzungen so dargestellt werden, wie sie in den meisten Bootstrapwiederholungen berechnet wurden.

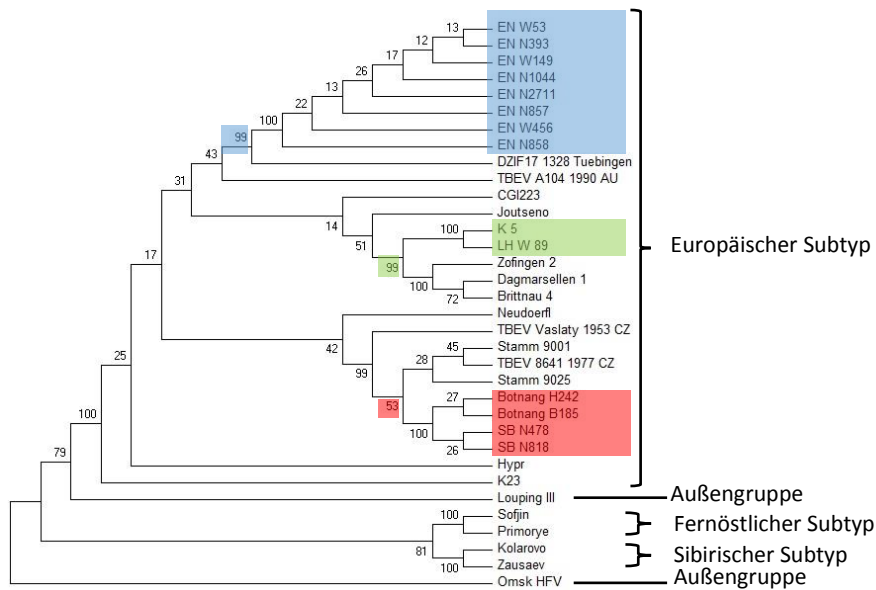


Abbildung 32: Maximum Likelihood Stammbaum auf Basis der Aminosäuresequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof

Die drei FSME-Subtypen, europäisch, sibirisch und fernöstlich sind auch in dem auf Basis der Nukleotidsequenzen berechneten Maximum-Likelihood Stammbaum klar getrennt. Ebenso existiert auch eine klare Abgrenzung der Kladen Emmendingen und Stuttgart Botnang, wobei letztere mit der ihr ähnlichsten Sequenzen direkt benachbart vorliegt, jedoch nur einen Bootstrapwert von 53 aufweist. Ebenso clustern die Stämme des Standortes Lorettohof mit denen aus der Schweiz. Auch hierbei zeigt sich die allgemein schwache Unterstützung innerhalb des europäischen Subtyps.

3.4. Untersuchungen zum Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Virusstämme in unterschiedlichen Zelllinien

Um das Wachstumsverhalten und damit die Infektiosität verschiedener FSME-Viren unter unterschiedlichen Bedingungen besser zu verstehen, wurden Zellen aus vier unterschiedlichen Zelllinien mit ausgewählten Virusstämmen infiziert und der zytopathische Effekt untersucht. In einer 24-Lochplatte wurden die Zellen angezüchtet und sobald diese mehr als 95% der Oberfläche bedeckten wurden sie mit den Viren infiziert. Anschließend erfolgte fünf Tage lang alle 24h eine mikroskopische Kontrolle sowie nach 8 Tagen eine Abschlusskontrolle des CPE. Dabei wurde protokolliert welcher CPE-Status erreicht war. Nach acht Tagen oder sobald alle Vertiefungen einer Platte einen CPE der Stufe 5 zeigten wurden der Versuch beendet, eine Probe genommen und mittels FSME-Virus spezifischer qrt-PCR auf FSME-Viren getestet um sicher zu stellen, dass der CPE auch tatsächlich auf die Infektion mit den Viren und nicht auf eine Kontamination mit Pilzen oder Bakterien zurück zu führen ist. Dabei wurden alle Versuche in einem Doppelansatz durchgeführt und das eingesetzte Virus in Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:10, 1:100 und 1:1000) verwendet, wobei das Ausgangsmaterial vorher per qrt-PCR auf FSME-Viren getestet wurde und dann so verdünnt wurde, dass die Verdünnungsstufe „unverdünnt“ bei allen Stämmen den gleichen CT-Wert in der qrt-PCR zeigte. Grundsätzlich zeigten die Verdünnungsstufen „unverdünnt“, 1:10 und 1:100 keine Unterschiede bezüglich des CPE. Dieser war lediglich die Verdünnungsstufe 1:1000 um 24 Stunden später zu beobachten. Diese Verzögerung erfolgte unabhängig von der gewählten Zelllinie und den untersuchten Virusstämmen.

3.4.1. Wachstumsverhalten der Virusstämme in PS-Zellen

Es zeigt sich, dass sowohl der Stamm Hypr, als auch der Stamm, der aus Rohmilchkäse des Lorettohofs isoliert werden konnte, in dieser Zelllinie die höchste Pathogenität besitzen. Den geringsten CPE zeigte der Stamm aus Emmendingen. Sowohl das Isolat aus Botnang, als auch aus Gengenbach erreichten einen CPE-Wert von 4 und zeigen damit eine mittlere Pathogenität im Vergleich zu den anderen Stämmen. Tabelle 42 zeigt diese Ergebnisse.

Tabelle 42: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von PS-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen.

| Zeit\Stamm | Hypr | K5 | EN N858 | M7-5b | B185 |
|------------|---------|---------|---------|-------|------|
| 24 h | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 h | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| 72 h | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| 96 h | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 120 h | 5 | 5 | 2 | 3 | 3 |
| 192 h | Beendet | Beendet | 3 | 4 | 4 |

3.4.2. Wachstumsverhalten der Virusstämme in A549-Zellen

Auch in dieser Zelllinie zeigt der Stamm Hypr das stärkste Vermehrungsverhalten. Ähnlich stark vermehrte sich der Stamm aus Botnang, während auch hier der Stamm aus Emmendingen die geringste Pathogenität aufwies. Ebenso wurde bei einer Infektion mit Viren aus der Gegend des Lorettohofs nur ein CPE von 3 beobachtet. Insgesamt vermehrten sich die Viren in dieser Zelllinie langsamer als in den PS-Zellen. Tabelle 43 zeigt den zeitlichen Verlauf des CPE bei einer Infektion von A549 Zellen mit FSME-Viren.

Tabelle 43: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von A549-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen

| Zeit\Stamm | Hypr | K5 | EN N858 | M7-5b | B185 |
|------------|------|----|---------|-------|------|
| 24 h | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 h | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 72 h | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 |
| 96 h | 3 | 2 | 2 | 2 | 3 |
| 120 h | 4 | 3 | 2 | 3 | 4 |
| 192 h | 5 | 3 | 3 | 4 | 5 |

3.4.3. Wachstumsverhalten der Virusstämme in Vero B4-Zellen

In dieser Zelllinie zeigte der Stamm vom Lorettohof, sowie der Stamm aus Stuttgart Botnang das stärkste Vermehrungsverhalten. Am langsamsten vermehrten sich die Viren des Stamms aus Gengenbach. Insgesamt waren die Zellen dieser Linie anfälliger für eine Infektion mit FSME-Viren als die Zelllinien PS und A549. Tabelle 44 zeigt den zeitlichen Verlauf des CPE der Infektion der Vero B4-Zellen.

Tabelle 44: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von Vero B4-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen.

| Zeit\Stamm | Hypr | K5 | EN N858 | M7-5b | B185 |
|------------|---------|---------|---------|-------|---------|
| 24 h | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 48 h | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 72 h | 3 | 3 | 2 | 1 | 4 |
| 96 h | 4 | 5 | 3 | 2 | 5 |
| 120 h | 5 | Beendet | 4 | 3 | Beendet |
| 192 h | Beendet | Beendet | 5 | 4 | Beendet |

3.4.4. Wachstumsverhalten der Virusstämme in MA 23-Zellen

In dieser Zelllinie zeigt keiner der verwendeten FSME-Stämme eine Vermehrung. Selbst eine Wiederholung des Versuchs und eine Verlängerung auf 14 Tage änderte nichts daran.

3.5. Neutralisationstest FSME-Viren

Ein Neutralisationstest stellt die einzige Möglichkeit dar, um neutralisierende Antikörper in Serumproben nachzuweisen. Dabei wurden Zellen mit einer Mischung aus Viren und inaktiviertem Serum in sechs verschiedenen Verdünnungsstufen überschichtet und die Anzahl der gebildeten Plaques nach sieben Tagen bewertet. Sämtliche Untersuchungen wurden auch hier im Doppelansatz durchgeführt. Dabei zeigten beide Versuchsreihen das gleiche Ergebnis. Die Verdünnungsstufe in der die Bildung von 90% der Plaques verhindert wurde wird als Titer bezeichnet.

Als Probenmaterial diente Serum von 7 Personen, das auf neutralisierende Antikörper gegen FSME untersucht werden sollte. Dabei zeigten die Proben die in Tabelle 45 dargestellten Titer. Abbildung 33 zeigt exemplarisch einen solchen Neutralisationstest. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Serumproben S4, S6 als auch S7 eine sehr große Anzahl neutralisierender Antikörper besitzen. Die Proben S2 und S5 besitzen hingegen nicht genügend um bei einer Verdünnung von 1:20 eine ausreichende Reduktion der Plaques zu bewirken.

Tabelle 45: Ergebnisse des Neutralisationstests.

| Probename | Titer | Bewertung |
|-----------|--------|-----------|
| S1 | 1:80 | Positiv |
| S2 | <1:20 | Negativ |
| S3 | 1:40 | Positiv |
| S4 | >1:640 | Positiv |
| S5 | <1:20 | Negativ |
| S6 | 1:320 | Positiv |
| S7 | 1:640 | positiv |

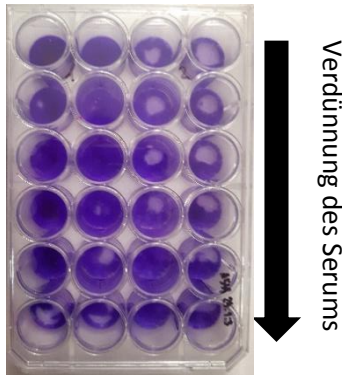


Abbildung 33: Exemplarische Darstellung des Neutralisationstests.

3.6. Molekularbiologische Erregernachweis von Hantaviren

Insgesamt wurden 127 Lungengewebsproben aus den Jahren 2015 und 2016 von 127 Nagetieren des Standorts Stuttgart Botnang mittels nested-One-Step-RT-PCR (Essbauer, et al., 2006) auf Hantaviren des humanpathogenen Typs Puumala getestet. Dabei wird zuerst ein 760 bp langes Fragment des S-Segments amplifiziert und anschließend ein darin liegendes Stück von 331 bp Länge. Von den 123 untersuchten Proben wurden 83 Lungengewebe positiv auf Hantaviren getestet. Dabei entfallen 75 auf die Proben des Jahres 2015 und elf auf das Jahr 2016. Daraus ergeben sich Prävalenzen von 78,5% für das Jahr 2015 und von 34,38% für das Jahr 2016 am Standort Stuttgart Botnang. Die Prävalenzen innerhalb der Art *M. glareolus* liegt bei 93,75% bzw. 44%. Tabelle 46 zeigt die Verteilung der positiv getesteten Proben auf die Jahre und Nagetierarten. Es zeigt sich, dass ausschließlich Tiere der Art *M. glareolus* nachweisbar mit Hantaviren infiziert waren.

Tabelle 46: Übersicht über die positiv auf Hantaviren des Typs Puumala getesteten Lungengewebsproben der Jahre 2015 und 2016 von dem Standort Stuttgart Botnang.

| Tierart | 2015 | | 2016 | |
|-----------------------|--------|---------|--------|---------|
| | Gesamt | Positiv | Gesamt | Positiv |
| <i>A. sylvaticus</i> | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>A. flavicollis</i> | 11 | 0 | 7 | 0 |
| <i>M. glareolus</i> | 80 | 75 | 25 | 11 |
| <i>R. norvegicus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 |

Abbildung 34 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer gelelektrophoretischen Auftrennung eines Teils der PCR-Amplifikate nach der zweiten PCR.

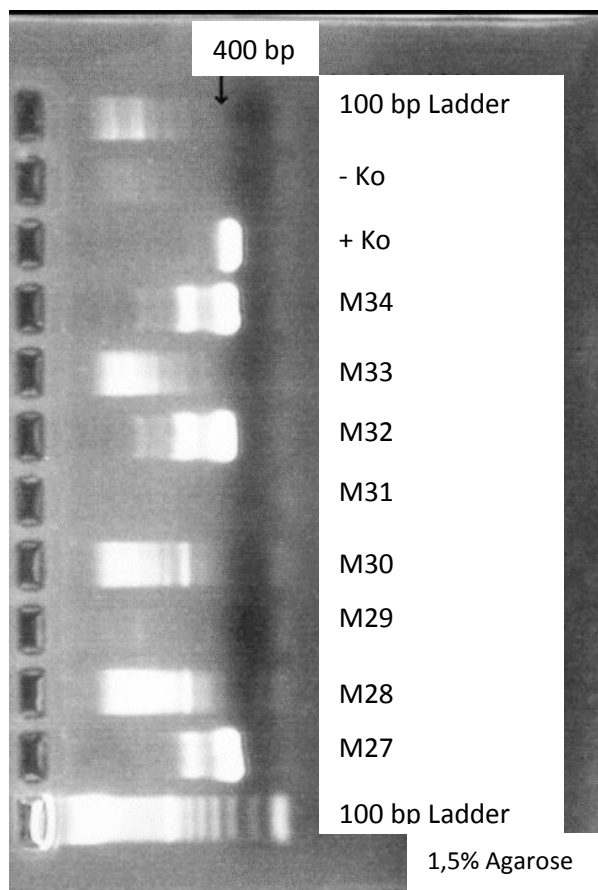


Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung einiger PCR Amplifikate des Hantaviren Nachweises.

4. Diskussion

4.1. Zeckenfang

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit 15483 Zecken im Laufe von drei Jahren an vier verschiedenen Standorten in Baden-Württemberg gefangen. Geflaggt wurde dabei im Zeitraum von März bis Oktober. Die Gesamtzahl untersuchter Zecken bewegt sich innerhalb der Grenzen anderer Studien, wobei Studien, in denen deutlich mehr Zecken untersucht wurden, auch deutlich mehr Standorte beinhalteten. Die Forschungsgruppe um Gäumann (2010) untersuchte dabei mehr als 62000 *I. ricinus* Zecken, die jedoch von 38 verschiedenen Standorten stammten. Ko et al (2010) fingen 6788 Zecken an 113 Standorten. Im Gegensatz dazu wurden nur 2980 *Ixodes ricinus* durch die Forschungsgruppe um Petersson (2014) geflaggt. Dabei stammten die Zecken aus dem Zeitraum Mai bis September und von 29 Standorten. Die Größe der in dieser Arbeit untersuchten Standorte lässt sich nicht mit anderen Studien vergleichen, da in diesen keine Angaben zur Ausdehnung der Fanggebiete gemacht wurden. Allerdings wurden die Standorte in den Studien von Petersson und Ko nur im Laufe eines Jahres untersucht und angesichts der hohen Anzahl untersuchter Gebiete möglicherweise auch nur einmalig beflaggt. In der Publikation von Gäumann (2010) sind außerdem keine Angaben zum Zeitraum, in dem Zecken gesammelt wurden, enthalten. Im Rahmen eines Forschungsprojekts der Gruppe um Petney (2015) wurden 3851 *I. ricinus* Nymphen von 16 Standorten aus zwei Jahren auf verschiedene Pathogene getestet. Dabei erfolgte das Flaggen auf einer Fläche von 100m² einmal pro Monat in den Monaten von März bis Oktober. Oehme et al. (2002) untersuchten 9189 Zecken von zehn Standorten, die im Zeitraum 1998 bis 2000 geflaggt wurden. Auch hier gibt es keine Information zur Größe und Anzahl der Flagaktionen der Gebiete. In der vorliegenden Arbeit wurden daher verhältnismäßig viele Zecken, gemessen an der Anzahl der Standorte, besonders vom Standort Emmendingen Neumattengraben (9732 Zecken), untersucht. Zusätzlich zu der sehr stark verbreiteten Zeckenart *Ixodes ricinus* konnten einige Exemplare anderer Schildzeckenspezies geflaggt werden. Dabei handelt es sich um Auwaldzecken (*Dermacentor reticulatus*), die Igelzecke (*Ixodes hexagonus*), *Ixodes acuminatus* und *Ixodes frontalis*. Alle am Standort Emmendingen gefundenen *Dermacentor*-Zecken wurden innerhalb von 10 Metern bei einem Flaggzug gesammelt. Weder in den folgenden Monaten noch in den anderen Untersuchungsjahren konnten weitere Auwaldzecken nachgewiesen werden. Es handelte sich daher vermutlich um eine einmalige Einschleppung durch Hunde oder möglicherweise auch durch Rotwild. Eine Studie von Dautel et al. aus dem Jahr 2006 untersuchte das Auftreten verschiedener Zeckenspezies auf Hunden und Rot-, sowie Damwild. Dabei konnte gezeigt werden, dass besonders Rotwild als Wirt für *D. reticulatus* fungiert und auch Hunde regelmäßig von der Auwaldzecke parasitiert werden, sofern sie sich in ihrem Habitat bewegen. Bei der Fundstelle handelt es sich um den Rand eines Waldweges, der regelmäßig von Spaziergängern mit Hunden frequentiert wird. Die Vertreter von *I. acuminatus* und *I. hexagonus*, die beide als endophil gelten, sind vermutlich von ihren Wirten (hauptsächlich kleinen Nagetieren beziehungsweise Igel) abgestreift worden oder haben diesen nach der Blutmahlzeit verlassen und sind so im Gelände verblieben. Außerdem ist es natürlich möglich, dass vereinzelt Exemplare in unmittelbarer Nähe eines Wirtsbaus geflaggt werden können (Sonenshine, et al., 2014).

Zusätzlich konnten am Standort Stuttgart Botnang bereits in einer früheren Arbeit (Drehmann, 2016), aber auch im Jahr 2016 *I. frontalis* Zecken nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um eine Zeckenart, die besonders häufig an Vögeln gefunden werden kann. Es liegt daher nahe, dass ein Vogel mindestens ein gesogenes Weibchen eingeschleppt hat, welches anschließend Eier im Garten gelegt hat. Diese Vermutung lässt sich dadurch unterstützt, dass alle im ersten Jahr gefundenen Individuen in einem Bereich von etwa 10m² gefunden wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf Basis des Probenumfangs gut mit denen anderer Arbeiten vergleichen lassen.

4.2. Nachweis von Pathogenen

4.2.1 Methodik

4.2.1.1 Molekularbiologischer Nachweis von Pathogenen in Zecken

Die Nukleinsäuren aller geflaggtten Zecken wurden in Pools aufgereinigt und auf FSME-Viren untersucht. Um im Anschluss jedoch bestimmen zu können wie viele Zecken des Pools FSME-Viren enthielten, wurden die Zecken einzeln homogenisiert. Wurde ein Pool positiv auf FSME-Viren getestet, so wurden die Homogenate einzeln aufgereinigt und ein weiteres Mal mittels qrt-PCR auf FSME-Viren getestet. Dabei wurde in jeder PCR sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativkontrolle mitgeführt, um ausschließen zu können, dass die Proben aufgrund von Kontaminationen des Mastermixes falsch positiv oder negativ bewertet werden. Diese waren immer zweifelsfrei interpretierbar. Im Jahr 1998 zeigte eine Arbeitsgruppe (Eistetter, et al., 1998), dass das Poolen von bis zu fünf adulten Zecken oder bis zu zehn Nymphen problemlos möglich ist, ohne dass die enthaltene Menge an PCR-inhibierenden Stoffen aus den Zecken negative Einflüsse auf das Ergebnis einer angeschlossenen PCR hätte. Da in dieser Arbeit dieselben Poolgrößen verwendet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die PCR-Reaktionen nicht gehemmt waren. Auch ein Experiment von Lindau (2013), bei dem negativ auf FSME-Viren getesteten Zeckenpools FSME-positiv Kontrollmaterial zugesetzt wurden, bestätigte die Ergebnisse von Eistetter et al. (1998).

Mit der verwendeten Nachweismethode (Schwaiger, et al., 2003) lassen sich alle FSME-Subtypen nachweisen, jedoch sind falsch-positive Ergebnisse durch Kreuzreaktionen mit anderen Flaviviren ausgeschlossen. Die Autoren gaben an, dass ein zuverlässiger Nachweis ab einer Ausgangsmenge von zehn Genomäquivalenten möglich ist. Jedoch wurden hierbei in Plasmiden vermehrte Teilstücke des FSME-Virusgenoms verwendet und keine Nukleinsäureextrakte aus Zecken. Im Rahmen einer Diplomarbeit (Jahn, 2009) wurde eine Nachweisgrenze von FSME-Viren von 10^4 TCID₅₀/ml beschrieben. Es ist daher nicht vollkommen auszuschließen, dass Zecken fälschlicherweise als negativ bewertet werden, wenn die Menge enthaltener FSME-Viren unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Die Nukleinsäureaufreinigungen der positiven Proben zeigten in der PCR einen Ct-Wert im Bereich von 25,2 bis 31,1 bzw. 38,1 am Standort Lorettohof. Dabei entspricht ein Anstieg des Ct-Werts von 3,322 etwa einer Reduzierung der Ausgangsmenge an amplifizierbarem Material um den Faktor 10. Bei dieser Berechnung wird die theoretische Verdopplung des Ausgangsmaterials pro PCR-Zyklus zugrunde gelegt. Dabei gilt $2^x = 10$. Eine Umformung nach x ergibt $x = \log_2 10 \cong 3,322$. Die Menge an amplifizierbarem FSME-Virusmaterial der in dieser Arbeit untersuchten Zeckenhomogenate stimmt mit den Ergebnissen anderer Nachweise von FSME-Viren in Zecken überein (Dobler, 03.2017), (Oehme, 2016).

4.2.1.2. Zellkulturelle Untersuchungen

Die FSME-Viren wurden aus zwei Gründen in der Zellkultur angezüchtet. Einerseits um mehr Material für Wachstumsversuche zu erhalten und andererseits um eine höhere Viruskonzentration für die molekularbiologische Charakterisierung zur Verfügung zu haben. Außerdem lässt sich der Virusstamm in konzentrierter Form besser lagern. Dazu wurden die Homogenate der in der qrt-PCR positiv auf FSME-Viren getesteten Proben in PS- und A549 Zellen angezüchtet. Die Wahl der Zelllinien wurde getroffen, da PS-Zellen bereits in früheren Arbeiten (Mandl, et al., 2000), (Jahn, 2009), (Wessel, 2010), (Saier, et al., 2015), sowie in der Routinearbeit des Landesgesundheitsamt Stuttgart

Verwendung finden. A549-Zellen werden sowohl im Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, als auch in anderen Arbeiten (Överby, et al., 2010) für die Anzucht und Experimente mit FSME-Viren verwendet. Bei allen Untersuchungen wurden nicht infizierte Zellkulturen als Negativkontrollen mitgeführt. Der Erfolg wurde während des Experiments mikroskopisch durch Beurteilung des CPE und nach dem Abschluss durch eine FSME-Virus spezifische qrt-PCR (Schwaiger, et al., 2003) überprüft. Der CPE (zytopathischer Effekt) beschreibt dabei Formveränderungen von Zellen, die aufgrund einer Infektion beobachtet werden können. Dabei handelt es sich beispielsweise um das Abkugeln einzelner Zellen und das Herauslösen aus dem Zellverband oder auch die Zerstörung der Zellen.

4.2.2. Untersuchungsstandorte

FSME-Viren sind, im Gegensatz zu anderen zeckenübertragenen Pathogenen und den Wirtstieren selbst, nur in sehr kleinräumigen Naturherden verbreitet (Kimmig, et al., 2001 (a)). Eine Studie aus dem Jahr 1963 geht dabei von einer Größe von 50000 m² bei einer Anzahl von wenigstens 700 Nagetieren aus (Pretzmann, et al., 1963). Es wird allerdings vermutet, dass sich diese Naturherde in Mikro- und Makrofokus unterteilen lassen, wobei die tatsächliche Viruszirkulation zwischen Zecke und Nagetier nur innerhalb des Mikrofokus stattfindet. Der Makrofokus stellt dabei den Bereich um den Mikrofokus herum dar, in dem der FSME-Virusstamm auftreten kann (Nosek, et al., 1978). Die Verteilung der Viren innerhalb des Makrofokus geschieht wahrscheinlich durch größere Säugetiere wie Füchse oder Rot- beziehungsweise Damwild (Dobler, et al., 2011). In einer Studie von Süß et al. aus dem Jahr 2004 konnte keine Korrelation zwischen den Faktoren Fokusgröße und Mindestanzahl an Nagetieren nachgewiesen werden.

Des Weiteren ist die Prävalenz von FSME-Viren in Zecken sehr gering. So liegt diese innerhalb eines FSME-Fokus zwischen etwa 0,14% in Nymphen und bis zu 5% in adulten Zecken (Aspöck, 2010) (Kupca, et al., 2010). Zusätzlich scheinen FSME-Naturherde nicht unbedingt dauerhaft aktiv zu sein, sodass in manchen Jahren keine Viren in geflaggten Zecken nachweisbar sind (Dobler, et al., 2011), (Petney, et al., 2015). FSME positive Zecken lassen sich in FSME-Naturherden erst nach einer Zeit latenter Aktivität wieder detektieren (Randolph, 2002). Das Zusammenspiel dieser Faktoren macht die Identifikation neuer FSME-Naturherde schwierig, sodass auf andere Methoden als das ungezielte Flaggen von Zecken und deren Untersuchung zurückgegriffen werden muss. Als vielversprechend hat sich dabei die Verwendung von FSME-Patienteninformationen, soweit verfügbar, erwiesen (Dobler, 03.2017).

Diese und weitere Fragestellungen wurden in der vorliegenden Arbeit an vier Standorten in Baden-Württemberg untersucht.

4.2.2.1. Standort Emmendingen

Der Standort Emmendingen Neumattengraben ist bereits aus einer früheren Arbeit (Lindau, 2013) als FSME-Gebiet bekannt. Allerdings fehlten Informationen zur genauen Ausdehnung des FSME-Fokus. Daher war es am Standort Emmendingen das Ziel den FSME-Mikrofokus genauer einzugrenzen. Zu diesem Zweck wurde der gesamte Bereich für das Jahr 2014 in vier Teilbereiche (A, B, C, D) gegliedert und es wurden während des gesamten Untersuchungszeitraums zweimal pro Monat Zecken gesammelt. In den Jahren 2015 und 2016 wurde der Fokus eingegrenzt und anhand der PCR-Ergebnisse des Vorjahres weiter unterteilt. So konnten Teile des Waldes ausgeschlossen werden, die entweder nur wenige Zecken aufwiesen (Teilgebiet A) oder aufgrund des starken Auftretens von Kletten-Labkraut (*Galium aparine*) während der Frühlings- und Sommermonate nur eingeschränkt entlang der Waldwege, flaggbar waren (Teilbereich D). Der im Jahr 2016 identifizierte FSME-Mikrofokus weist dabei eine Länge von etwa 300 Metern und eine Breite von etwa 70 Metern auf. In diesem Areal gibt es fast ausschließlich Laubbäume (viele Rotbuchen) und einem kleinen Bachlauf, der auch im Hochsommer wasserführend ist. Die Kombination dieser Merkmale, die den Zecken eine

hohe relative Luftfeuchte auch während der heißen Sommermonate bietet, führt zu einer höheren Aktivität im Vergleich mit anderen Standorten.

Im gesamten Untersuchungszeitraum konnten sieben FSME-positive Zecken nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden die geflaggte Zecken nach Bereichen getrennt mittels qrt-PCR (Schwaiger, et al., 2003) auf FSME-Viren untersucht. Die molekularbiologische Untersuchung der Zecken des Jahres 2014 zeigte, dass lediglich in Zeckenhomogenaten aus den Bereichen B und C FSME-Viren nachweisbar waren. Die Anzahl der positiv getesteten Proben ergibt bei einer Anzahl von 1727 untersuchten Zecken eine Prävalenz von 0,12%. Im folgenden Jahr wurden nur die Bereiche B und C auf Zecken untersucht, wobei insgesamt 3946 Zecken auf FSME-Viren getestet wurden. In diesem

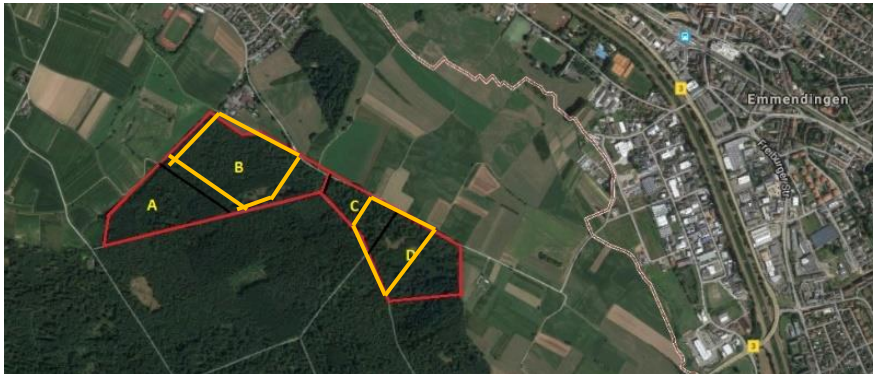


Abbildung 35: Lage der einzelnen Untersuchungsgebiete im Jahr 2015. Bereiche A und D wurden nicht untersucht. In gelb markierte Bereiche waren in den Monaten März und April wegen Waldarbeiten nicht zugänglich.

Jahr wurden, trotz deutlich höherer Zeckenzahl, nur zwei FSME-positive Zecken gefunden. Allerdings lässt sich der Fundort dieser beiden Zecken weiter eingrenzen. Die beiden positiv getesteten Zecken stammen, je eine aus den Teilbereichen B und C, sowie beide aus dem Monat April. Die äußeren Bereiche der Gebiete B und C waren sowohl im März, als auch im April wegen Waldarbeiten abgesperrt, während der innere Bereich, das Grenzgebiet von B und C zueinander, ebenfalls aufgrund geplanter Waldarbeiten von Mitte Mai bis Ende Juli abgesperrt war. Da die positiven Zecken im April gesammelt wurden, während die äußeren Bereiche unzugänglich waren (vgl. Abbildung 35), können diese nur aus dem Grenzbereich der Gebiete B und C stammen. Die niedrige Prävalenz liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die meisten Zecken (ca. 85%) in den äußeren Teilen der Bereiche geflaggt werden konnten und somit der Anteil der Zecken, der tatsächlich innerhalb des Fokus gefangen wurde, deutlich niedriger ist. Die Prävalenz des Jahres 2015 mit 0,0051% ist im Vergleich zu anderen Arbeiten, in denen Werte von 0,1% bis 1,7% (Han, et al., 2005), (Kupca, et al., 2010), bzw. bis zu 14,3% (Casati, et al., 2006) ermittelt werden, sehr niedrig. Die Prävalenzen der Jahre 2014 und 2015 sind, aufgrund der räumlichen Verteilung von FSME-Viren in der Natur, jedoch nur eingeschränkt auf den Mikrofokus übertragbar, da hierbei deutlich größere Gebiete als der im Jahr 2016 identifizierte Fokus selbst untersucht wurden. Aufgrund dieser Daten wurde der Grenzbereich von B und C für das Jahr 2016 in drei Teile gegliedert (a, b, c; vgl. Abbildung 26) und die Zecken aus diesen Bereichen ebenfalls getrennt auf FSME-Viren untersucht. Dabei wurde jeweils eine Zecke aus den Bereichen a, b und c positiv auf FSME-Viren getestet. Da der Mikrofokus somit erfolgreich auf eine Fläche von etwa 300 x 70 Metern (ca. 21.000m²) eingegrenzt werden konnte, wurden die übrigen Zecken nicht auf FSME-Viren untersucht. Die Ergebnisse des Jahres 2016 stellen daher die Prävalenz der Viren in Zecken innerhalb des Mikrofokus am präzisesten dar und liegen mit 0,51% im Bereich anderer Studien.

Die Isolierung der FSME-Viren durch Anzucht in der Zellkultur war bei allen positiv getesteten Zeckenhomogenaten erfolgreich. Außerdem wurden die Isolate für weitere Untersuchungen sequenziert.

4.2.2.2. Standort Lauterbach

Die Wahl des Standortes Lauterbach wurde aufgrund eines humanen Erkrankungsfalls mit FSME getroffen, bei dem der Patient erinnerte sich an einen Zeckenstich aus dem untersuchten Gebiet hatte (Oehme, 2013). Landschaftsbestimmend sind hier die starke Südhanglage sowie eine relativ lichte Laubwaldvegetation. Außerdem ist in einigen Bereichen nur sehr wenig, den Boden bedeckende, Vegetation vorhanden, weshalb die Zeckendichte in diesen Bereichen sehr gering ist. Auch dieser Standort sollte in den Jahren 2014 und 2015 zweimal pro Monat beflaggt werden. Allerdings war dies nicht durchgängig möglich, da die niedrigen Temperaturen und der häufige Regen im Jahr 2014 das Beflaggen erst ab Ende März sinnvoll machten. Deshalb wurde in diesem Monat nur einmal geflaggt, während das Wetter im September und Oktober 2014 und im Oktober 2015 zu regnerisch war, um Zecken fangen zu können.

In den Untersuchungsjahren konnten in keiner der 2554 geflaggtten Zecken FSME-Viren nachgewiesen werden. Allerdings kann es verschiedene Gründe geben, warum keine entsprechende Zecke gefunden wurde. Einerseits ist das Gebiet, aus dem die Zecke stammen soll, recht groß; andererseits war die Zeckendichte aufgrund einer recht dünnen Laubschicht sowie weniger schattigen Arealen recht niedrig. Es handelt sich bei dem Standort also um einen zumindest teilweise schwierigen Lebensraum für Zecken (Aspöck, 2010) (Satz, 2006). Für die Identifizierung des Mikrofokus wäre es daher sinnvoll auch in weiteren Jahren Zecken dieses Standortes auf FSME zu untersuchen. Es muss aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der Patient sich zwar an einen Zeckenstich aus diesem Gebiet erinnert, es sich dabei allerdings nicht um den der FSME-infizierten Zecke handelt und diese an einem anderen Ort abgestreift wurde. Außerdem ist es möglich, dass es sich bei der Zecke um eine einmalige Einschleppung, beispielsweise durch ein Reh oder einen Vogel, aus einem tatsächlichen FSME-Mikrofokus gehandelt haben könnte, die nach einer Häutung am Patienten Blut gesaugt hat. Des Weiteren ist denkbar, dass der dort existierende Fokus während des Untersuchungszeitraums nur eine latente und daher nicht detektierte Aktivität besaß, oder vollständig erloschen ist. Die Arbeitsgruppe Süß et al. konnte sowohl das Verschwinden, als auch die nur vorübergehende Aktivität von Naturherden in Mecklenburg-Vorpommern bzw. Thüringen zeigen (Süß, et al., 2004).

4.2.2.3. Standort Stuttgart Botnang

Der FSME-Mikrofokus am Standort Stuttgart Botnang befindet sich auf einem Privatgrundstück, ist bereits seit dem Jahr 1988 als solcher bekannt und wurde seitdem immer wieder im Rahmen verschiedener Projekte und Arbeiten auf FSME-Viren in Zecken untersucht. Im Jahr 2015 wurde dieser Standort außerdem im Rahmen eines Projekts (Drehmann, 2016) bearbeitet und dabei zweimal pro Monat beprobt. Insgesamt wurden dabei 533 Zecken geflaggt und auf FSME-Viren untersucht, die jedoch alle negativ waren. Ein Nachweis von FSME-Viren an diesem Standort war jedoch auch in früheren Jahren nicht immer möglich (Drehmann, 2016). Es ist nicht ungewöhnlich, dass in manchen Jahren keine FSME-Viren nachgewiesen werden konnten. So zeigt eine Studie von Frimmel et al. aus dem Jahr 2014, dass FSME-Mikrofokuse viele Jahre mit einer sehr geringen Aktivität, also einer sehr niedrigen Prävalenz der Viren in Zecken, überdauern können. Dabei untersuchte die Gruppe einen Standort, der im Jahr 1992 von Süß et al. als FSME-Naturherd identifiziert worden war (Süß, et al., 1992), allerdings konnten seitdem keine weiteren FSME-positiven Zecken gefunden werden. Es gelang Frimmel et al. (2014) das Virus in sechs Zecken aus diesem Naturherd nachzuweisen.

Um die Anzahl gefangener Zecken am Standort Stuttgart Botnang zu erhöhen, wurde im Jahr 2016 bis zu viermal, in den Monaten Mai bis August geflaggt. Durch diese Maßnahme konnte die Zahl gesammelter Zecken auf 2257 erhöht werden. Bei den anschließenden Untersuchungen wurde das FSME-Virus in zwei Zeckenpools nachgewiesen. Die Einzeluntersuchung der Zeckenhomogenate zeigte, dass jeweils eine Zecke FSME-Viren enthielt. Die Viren aus den beiden positiv getesteten Zeckenhomogenaten wurden erfolgreich in der Zellkultur vermehrt und isoliert, sowie für weitere Analysen sequenziert. Die sich daraus ergebende Prävalenz von 0,009% in Botnang ist deutlich niedriger als aus den anderen Untersuchungsjahren bekannt. Eine Baden-Württemberg weite Studie während der 1990er Jahre wies eine FSME-Prävalenz von 0,5% in Zecken am Standort Stuttgart Botnang nach (Oehme, et al., 2002), während in den Jahren 2012 und 2013 Prävalenzen von 1,44% und 0,24% detektiert wurden (Pfäffle, et al., 2014). Obwohl der Standort verglichen mit den anderen recht klein ist (etwa 100m x 50m) wird ein Großteil des Standorts von Wald bedeckt, der durch die Besitzer fast nicht verändert wird, sodass sowohl Zecken als auch Wirtstieren ein Habitat in Waldrandlage zur Verfügung steht. Da der natürliche Übertragungszyklus von FSME-Viren in Naturherden zwischen Zecken und Nagern als Reservoirwirten verläuft, wurden zusätzlich zu den Zecken des Standorts auch Nagetiere durch die Gartenbesitzer gefangen. Dabei wurden Organproben der Nagetiere auf FSME-Viren untersucht. Das Fangen der Nagetiere geschah durchgängig in den Jahren 2015 und 2016 im Rahmen einer privaten Schädlingsbekämpfung. Die verwendeten Todschnallen wurden abends ausgelegt und sofern nicht bereits während des Auslegens eine Maus gefangen wurde, wurden die Fallen am nächsten Morgen kontrolliert. Alle gefangenen Tiere wurden bei -20°C eingefroren. Auf diese Weise wurden im Jahr 2015 insgesamt 95 Individuen von vier unterschiedlichen Nagetierarten gefangen, während es im Jahr 2016 nur 32 Exemplare waren. Größtenteils (105 von 127) handelte es sich bei den gefangenen Tieren um Vertreter der Art *M. glareolus*, der Rötelmaus. Außerdem wurden 18 Exemplare der Gelbhalsmaus, *A. flavicollis* und drei Exemplar der Waldmaus und eines der Wanderratte gefangen. Die beiden letztgenannten Arten sind als Beifänge zu betrachten. Alle gefangenen Spezies sind in einem Garten, der anteilig aus Wald besteht und am Ortsrand liegt, zu erwarten (Dieterlen, 2005 (a)). Die deutlich geringere Anzahl gefangener Individuen im Jahr 2016 kann mehrere Ursachen haben. Während des Monats Juli wurden keine Nagetiere gefangen wodurch sich die Gesamtzahl allerdings nur leicht verringern sollte. Außerdem scheinen die Fangzahlen des Vorjahres sehr hoch zu sein, sodass auch dies den Nagetierbestand des Jahres 2016 negativ beeinflusst haben könnte. Die Forschungsgruppe Petney et al. zeigte 2015, dass sich eine niedrige Nagetierpopulation innerhalb eines Jahres erholen kann. Bedingt ist die Möglichkeit dieser Erholung hauptsächlich durch das Nahrungsangebot, die Länge und Strenge des Winters, sowie Änderungen im Prädatorendruck. Wobei die Erholung des Bestands des Jahres 2016 erst 2017 nachweisbar gewesen wäre (Petney, et al., 2015). Alle fünf bis zehn Jahre produzieren sowohl Buchen, als auch Eichen deutlich mehr Früchte als in den übrigen Jahren. Diese Jahre werden als Buchenmast-, bzw. als Eichenmastjahre bezeichnet. Die lange Zeit gültige Abfolge von Mast-, und Nichtmastjahren verliert jedoch während des letzten Jahrzehnts zunehmend an Zuverlässigkeit, sodass häufig zwischen einzelnen Jahren kaum Unterschiede hinsichtlich der Fruchtmenge bei gleichbleibend hohem Niveau zu verzeichnen sind (Bertram, pers. Kommunikation, 2017). Auch die Jahre 2014 und 2015 zeichnen sich in Stuttgart Botnang durch eine sehr große Anzahl an Eicheln und Bucheckern aus. Es ist daher anzunehmen, dass die Menge an verfügbarer Nahrung keinen stark limitierenden Einfluss auf die Populationsgröße der Nagetiere am Standort Stuttgart Botnang hatte. Außerdem möglich wäre ein Einfluss durch eine ansteigende Anzahl natürlicher Prädatoren wie beispielsweise Katzen und Füchsen, die häufig im Garten gesehen wurden (Tierley, Grimm, pers. Kommunikation, 2016). Der Winter 2015/16 war sehr mild mit nur 3 Tagen, an denen die Tageshöchsttemperatur unter 0°C lag (Wetteronline.de, 2017), sodass eine Erholung des Bestandes als wahrscheinlich anzusehen ist (Petney, et al., 2015).

Ein Vergleich der Anzahl gefangener Nagetiere mit anderen Studien ist an dieser Stelle schwierig, da das in dieser Arbeit untersuchte Areal im Verhältnis zu anderen Studien sehr klein ist (Pettersson, et al., 2014). So untersuchte das Team um Sauvage (2002) die Prävalenz von Hanta-Virus-Antikörpern in Nagetieren in den Ardennen (Frankreich) in den Jahren 1997-1999. Dabei wurden in über 25.000 Fallennächten 550 Nagetiere gefangen, davon 235 Rötelmäuse. Im Gegensatz zu den untersuchten Gebieten in den Ardennen bietet der Standort Stuttgart Botnang jedoch durch seine Nähe zu einer Kleingartenanlage zusätzliche Nahrungsressourcen durch vorhandene Komposthaufen sowie das ganzjährige Füttern von Vögeln und Eichhörnchen. Vergleicht man jedoch die Anzahl an Fallennächten der Studie mit denen aus Botnang (etwa 2800), so wird deutlich, dass eine deutlich größere Anzahl an Nagetieren gefangen werden konnte. Es handelt sich daher bei dem Standort Stuttgart Botnang um ein sehr nagetierreiches Untersuchungsgebiet. Die Arbeitsgruppe um Escutenaire zeigte 2002, dass besonders Habitats mit vielen Laubbäumen und dichtem Unterwuchs von Nagetieren bevorzugt werden und dort auch in populationsschwachen Jahren mehr Individuen vorhanden sind. Dieser ideale Lebensraum steht in Stuttgart Botnang zur Verfügung, während in den übrigen Studien keine genauen Angaben zur Vegetation in den Untersuchungsgebieten gemacht werden.

Bringt man die erfolgten Nachweise von FSME-Viren in Zecken in Verbindung mit den am selben Standort gefangenen Nagetieren, so zeigt sich ein negativer Zusammenhang zwischen der Anzahl gefangener Nagetiere und positiv getesteter Zecken. Diese Tatsache unterstützt nicht die von Ostfeld im Jahr 2001 geäußerten Hypothese, dass eine höhere Nagetierdichte auch zu einer höheren Infektionsrate in Zecken führt, da sich Zecken im Allgemeinen an den Reservoirwirten der FSME-Viren, den Nagetieren, infizieren. Es wurde zwar auch eine transovarielle Übertragung von FSME-Viren in Zecken nachgewiesen (Danielova, et al., 1991), jedoch ist diese mit einer Infektionsrate von durchschnittlich einem von 400 Eiern (Satz, 2006) sehr niedrig. Die transovarielle Übertragung ist vermutlich hauptsächlich für die Erhaltung eines Mikrofokus und möglicherweise für eine Verbreitung der Viren an andere Standorte von Bedeutung (Randolph, et al., 1998). Die Verbreitung geschieht in diesem Fall durch das FSME-positive, blutsaugende und bereits befruchtete Weibchen, das an einem bisher FSME-freien Standort von seinem Wirt abfällt und dort Eier legt. Allerdings decken sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer anderen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass ein negativer Zusammenhang zwischen Nagetierzahl und Infektionsrate in Zecken zumindest in Deutschland besteht (Petney, et al., 2015). Begründet liegt dies im Co-feeding von Zecken. Dabei handelt es sich um die Tatsache, dass, wenn Zecken in enger räumlicher Nähe zueinander Blut saugen, Pathogene von einer Zecke auf die nächste übertragen werden können, ohne dass der Wirt eine Virämie oder Bakteriämie aufweisen muss (Randolph, et al., 1996). Dies ist besonders für das FSME-Virus nachgewiesen worden (Labuda, et al., 1997). Eine mögliche Immunität des Tiers gegen FSME-Viren ist dabei nicht von Bedeutung, da die Viren ohne Einfluss des Immunsystems des Wirtstiers übertragen werden (Labuda, et al., 1997), (Randolph, 2011). Beim Co-feeding erhöht sich die Anzahl an Zecken, die durch eine einzelne FSME-Viren tragende Zecke infiziert werden können in Abhängigkeit von der Infestationsdichte der Nagetiere. Petney et al. zeigten 2015, dass die Infestationsdichte von Zecken an Nagetieren mit abnehmender Nagetierdichte steigt. Dadurch saugen viele Zecken an wenigen Nagetieren und die Wahrscheinlichkeit auf Co-feeding steigt. Den gegenteiligen Zusammenhang, dass eine höhere Nagetierdichte zu einer niedrigeren Prävalenz von FSME-Viren in Zecken eines Standortes führt, zeigten Rosà und Pugliese im Jahr 2007 mathematisch anhand von Daten aus Norditalien. Dies wird auch als Dilution-Effekt bezeichnet. Darüber hinaus scheint Co-feeding der Hauptübertragungsweg von FSME-Viren mit Nagetieren als Reservoirwirten zu sein, da deren virämische Phase nur von kurzer Dauer ist (Dobler, et al., 2011). Durch diesen Zusammenhang führen Buchenmastjahre, die einen lokalen Anstieg der Nagetierdichte zur Folge haben, zu einer niedrigeren Prävalenz von FSME-Viren in Zecken.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der geflaggtten Zecken wurden sowohl Gehirn-, als auch Milzmaterial der gefangenen Nagetiere auf FSME-Viren getestet. Der molekularbiologische Nachweis wurde mittels einer FSME-Virus spezifischen qrt-PCR (Schwaiger, et al., 2003) durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 127 Milzproben und 126 Gehirnproben untersucht. Es konnten in keiner Probe FSME-Viren nachgewiesen werden. Bereits in anderen Studien (Achazi, et al., 2011), (Kim, et al., 2008) wurden Organproben von Nagetieren erfolgreich mittels PCR auf FSME-Viren untersucht. Da auch in diesen Studien Material aus Gehirnen und/oder Milz verwendet wurde, ist es nahezu auszuschließen, dass der nicht erfolgte Nachweis der Viren auf die Auswahl des falschen Probenmaterials zurückzuführen ist. Achazi et al. (2011) untersuchten Proben von 445 Nagetieren von 12 Standorten (3-98 Nagetiere / Standort) und wiesen das Virus erfolgreich in 10% aller Nagetiere in einem der beiden Organe nach. Die Prävalenz der Viren in Nagetieren schwankte dabei je nach Standort zwischen 0% und 20%. Allerdings wurden in dieser Studie sowohl Nagetiere aus FSME-Risikogebieten als auch Nichtrisikogebieten untersucht, wobei die Prävalenz in Risikogebieten zwischen 5% und 20% lag. Im Gegensatz dazu untersuchten Kim et al. (2008) nur 24 Nagetiere und wiesen dabei das Virus molekularbiologisch in 5 Proben nach, was einer Prävalenz von knapp 21% entspricht. Des Weiteren ist es nicht auszuschließen, dass an dem Standort Stuttgart Botnang FSME-positive Nagetiere leben und diese einfach nicht gefangen wurden. Auch ein Abbau enthaltener Viren durch fehlende Kühlung des Probenmaterials kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, obwohl die Entnahme der Proben zeitgleich mit denen für die Untersuchung auf Hantaviren erfolgte, von denen sehr viele positiv getestet wurden. Ein Vergleich der Methodik ist hier nur begrenzt möglich, da keine der Arbeitsgruppen Angaben zur Fangmethode beziehungsweise zur Art der verwendeten Fallen macht. Lediglich das Vorgehen bei der Lagerung der Nagetiere bis zur Durchführung des Nachweises ist mit denen der Arbeitsgruppe Achazi et al. identisch, sodass ein fehlerhafter Umgang mit den toten Nagetieren ausgeschlossen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls das Auftreten von Hantaviren des Typs Puumala mittels rt-nested-PCR nach Essbauer et al., 2006 an diesem Standort untersucht. Dabei diente Lungengewebe der Nagetiere als Ausgangsmaterial. Insgesamt wurden 127 Proben aus den Jahren 2015 und 2016 untersucht. Dabei entfallen 95 Proben auf das Jahr 2015 und nur 32 auf das Jahr 2016. Von den im Jahr 2015 untersuchten Proben stammen 80 von *M. glareolus* und 11 von *A. flavicollis*. Außerdem wurde Lungengewebe von einer Wanderratte und drei Waldmäusen untersucht. Insgesamt wurden 75 Lungengewebsproben positiv auf Puumalaviren getestet. Alle diese Proben stammen von Rötelmäusen. Die dabei errechnete Prävalenz von 93,75% in *M. glareolus* ist sehr hoch. Die im Folgejahr nachgewiesene Durchseuchung in Rötelmäusen fällt mit 44% deutlich geringer aus. Es wurde keine spillover Infektionen detektiert. Der Begriff spillover Infektion beschreibt den Vorgang des Übergehens eines hochspezialisierten Erregers wie Hantaviren auf andere Wirtstiere als den üblichen Reservoirwirt. So wurden Hantaviren des Typs Puumala bereits in *Microtus arvalis*, der Feldmaus und in *A. sylvaticus* nachgewiesen (Kinström, et al., 2002).

Bereits in früheren Jahren waren Nagetiere aus dem Untersuchungsgebiet auf Hantaviren getestet worden. Dabei zeigten sich durchgängig hohe Prävalenzen (>50%) in Rötelmäusen, die jedoch nie über 70% lagen (Oehme, 2016). Andere Studien wiesen Prävalenzen zwischen 10% und 90% nach, wobei die hierbei in Baden-Württemberg ermittelten Prävalenzen zwischen 20% und 76% lagen (Ulrich, et al., 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Prävalenz des Jahres 2015 ist daher im sehr hohen Bereich anzusiedeln und vermutlich auf die ausgesprochen hohe Nagetierdichte in diesem Jahr zurückzuführen (Grimm & Tierley, pers. Komm., 2016). Im Gegensatz dazu befindet sich das Jahr 2016 mit 44% nur im unteren Mittelfeld. Diese Untersuchungen zur Prävalenz spiegeln sich auch in den an das RKI gemeldeten humanen Erkrankungsfällen der beiden Jahre wider. So infizierten sich im Stadtkreis Stuttgart 2015 53 Personen nachweislich mit Puumalaviren, während es im Jahre

2016 nur acht Personen waren. Dieses Verhältnis kann auf ganz Baden-Württemberg übertragen werden. So waren es im Jahre 2015 474 humane Fälle und im Jahr 2016 nur 67.

Die deutlich unterschiedlichen Prävalenzen in den beiden Untersuchungsjahren zeigen eine starke Korrelation mit der Nagetierdichte und stehen damit im Gegensatz zur Korrelation, die zwischen FSME-Viren in Zecken und der Nagetierdichte herrscht. Mehrere Studien wiesen diesen Zusammenhang zwischen Hanta-Viren und FSME Viren nach (Mills, et al., 1999), (Davis, et al., 2005). Dieser Zusammenhang wird durch die Übertragungsart des Virus erklärt. Durch die direkte Übertragung über Kot und Urin von einem chronisch infizierten Nagetier auf gesunde Nagetiere steigt die Übertragungsrate bei höherer Nagerdichte (Mills, et al., 1999), (Avsic-Zupanc, et al., 2016).

4.2.2.4. Standort Lorettohof

Der Standort Lorettohof wurde anhand zweier humaner Erkrankungsfälle nach Konsum von Ziegenrohmlchkäse ausgewählt.

Am Standort Lorettohof wurde nur dreimal auf der Suche nach FSME-positiven Zecken und dem FSME-Mikrofokus geflaggt. Die Zecken wurden gesammelt und auf FSME-Viren untersucht, um diese molekularbiologisch mit den Virussequenzen aus den Milchproduktproben vergleichen zu können und so eine Verbindung zwischen den Viren in den Zecken und den Viren in den untersuchten Milchprodukten herstellen zu können. Außerdem sollte, wenn möglich, der Infektionsort der Ziegen mit FSME-Viren ausfindig gemacht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zecken an den Orten geflaggt, die den Ziegen des Hofes in der Zeit von April bis Mai als Weidefläche gedient hatten, beziehungsweise entlang der Triebwege dorthin. Dabei wurden insgesamt 407 Zecken auf FSME-Viren untersucht, wobei ein Weibchen positiv getestet wurde. Aus dem Gebiet, aus dem das Weibchen stammt, wurden insgesamt 318 Zecken untersucht. Die sich daraus ergebende Prävalenz von 0,31% liegt im unteren Bereich der für FSME-Mikrofokuse beschriebenen Werte (Han, et al., 2005) (Dobler, et al., 2011). Es ist notwendig, weitere Zecken zu flaggen, um die Ausdehnung des Naturherdes zu ermitteln, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei den wenigen durchgeführten Flaggaktionen der Naturherd nur gestreift wurde. Zudem wurden die untersuchten Zecken außerhalb der Hauptaktivitätszeit der Zecken und Hauptübertragungszeit von FSME-Viren im Frühling und Frühsommer geflaggt (Korenberg, 2000), (Randolph, et al., 1998). Daher ist zu erwarten, dass die FSME-Prävalenz in Zecken deutlich ansteigt, wenn Zecken aus dem entsprechenden Zeitraum untersucht werden. Eine Studie, in der Standorte anhand humaner Erkrankungsfälle gesucht wurden, wies dabei das Virus viermal in 77 geflaggten Zecken des vermuteten Standortes nach (Frimmel, et al., 2014), (Dobler, 05.2017). Sowohl die genaue Position des Mikrofokus, als auch die tatsächliche Infektionsrate in Zecken sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Der Virusstamm aus der Zecke sollte ebenfalls in der Zellkultur vermehrt werden, was jedoch auch nach 5 Passagen nicht gelang. Die Zellkultur zeigte in der ersten Passage nach sieben Tagen einen leichten CPE (weniger als 25% des Zellrasens war zerstört), wies jedoch nach einer Sterilfiltration vor der zweiten Passage, sowie in den folgenden Passagen gar keinen CPE mehr auf. Allerdings war das für die qrt-PCR entnommene Material der ersten beiden Passagen immer noch schwach positiv auf FSME-Viren; allerdings mit steigendem Ct-Wert (37,1 auf 38,8), was einer Reduzierung der nachweisbaren Virusmenge von etwa 70% entspricht. Obwohl auf einen möglichst schonenden Umgang und eine dauerhafte Kühlung geachtet wurde, kann eine Degradierung der Erreger-RNA nicht ausgeschlossen werden. Die Probe wurde außerdem mit einem recht hohen Ct-Wert von 38,1 in der qrt-PCR detektiert. Dies deutet bereits daraufhin, dass nur sehr wenige Viruspartikel in dem Homogenat enthalten sind. Es ist daher auch möglich, dass diese Menge zu gering war, um eine Infektion der Zellen zu verursachen. Auch hierbei ist eine weitere Untersuchung des Standortes

sinnvoll um anzüchtbares Virusmaterial zu erhalten, das für weitere Fragestellungen zur Verfügung stehen würde.

Außerdem wurden 23 verschiedene Ziegenrohmilchprodukte mittels qrt-PCR (Schwaiger, et al., 2003) auf FSME-Viren untersucht. Dabei zeigten sechs Proben ein positives Ergebnis, wobei der Ct-Wert im Vergleich zu Nachweisen aus Zecken deutlich höher im Bereich von 35,8 bis 38,7 lag. Ein Vergleich mit anderen Studien ist an dieser Stelle leider nicht möglich, da keine Daten zu Virusmengen in Käse vorhanden sind.

Im Rahmen des Anzuchtversuchs der positiv getesteten Proben wurden jeweils 10 weitere Proben aus diesen Käseprodukten entnommen und ebenfalls auf FSME-Viren untersucht. Dabei zeigte sich, dass nicht jede Probe positiv war, sondern lediglich 20% - 40% des untersuchten Materials nachweisbar FSME-Viren enthielt. Das durchgeführte Spikeexperiment mit den Nukleinsäureaufreinigungen der Milchprodukte zeigt eindeutig, dass keine PCR-Inhibitoren in den Eluaten enthalten sind. Falschnegative Virusnachweise können somit ausgeschlossen werden. Daher scheint die Verteilung der Viruspartikel im untersuchten Ziegenkäse sehr ungleichmäßig zu sein. Ein Vergleich mit anderen Studien ist auch hier nur schwer möglich, da keine Untersuchungen zur Verteilung von viralen Erregern in unpasteurisiertem Ziegenkäse vorliegen. Allerdings zeigte Shapoval 1977, dass die Infektiosität von FSME-Viren in Milchprodukten über längere Zeit erhalten bleibt und das Virus auch fünf bis 25 Tage nach der Infektion einer Ziege in deren Milch nachweisbar ist. Des Weiteren untersuchte Gresikova-Kohutova 1959 die thermische Stabilität von FSME-Viren. Dabei zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 50°C während einer Dauer von 10 Minuten bereits 50% der Infektiosität verloren gehen können. Allerdings wird für die eine vollständige Inaktivierung des Virus in Milch sowohl eine deutlich höhere Temperatur (65°C), als auch eine längere Zeitdauer (15 Minuten) benötigt. Dahin gegen zeigt eine neuere Studie (Saier, et al., 2015), dass die Abnahme der Viruskonzentration während des Erhitzens nicht linear verläuft, sondern im späteren Teil einer logarithmischen Abnahme entspricht. Dabei wurde in einem ersten Schritt entrahmte Milch mit FSME-Viren des Stammes Hypr angereichert und anschließend während einer bestimmten Zeit Temperatur zwischen 65°C und 80°C ausgesetzt. Um die Infektiosität zu untersuchen wurden Zellkulturen mit einem Deckmaterial überschichtet und ein Plaquebildungsassay durchgeführt. Dieses Verhalten konnte bereits für andere Viren (Bakteriophagen) nachgewiesen werden und wurde zurückgeführt auf Zusammenlagerungen von Viruspartikeln, oder deren Anlagerung an die Wände des verwendeten Gefäßes (Suarez, et al., 2002), (Atamer, et al., 2009). Eine weitere mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Hitzestabilität einzelner Viruspartikel eines Stammes sein (Hiatt, 1964). Zwar werden bei der Herstellung von Rohmilchkäse auch höhere Temperaturen verwendet, die jedoch lediglich im Bereich von 50°C bis 60°C liegen und somit nur einen geringen Einfluss auf die Infektiosität von FSME-Viren haben (Gresikova-Kohutova, 1959). Zusätzlich zeigte die Arbeitsgruppe um Danielle K. Offerdahl (2016), dass Temperaturen, wie sie typischerweise bei der Käseproduktion Verwendung finden die Menge an Viren im Produkt zwar signifikant reduzieren, jedoch nicht gänzlich abtöten. Bei diesen Untersuchungen wurden allerdings Langat-Viren verwendet, die den FSME-Viren genetisch sehr ähnlich sind.

Die Anzucht von FSME-Viren aus Rohmilchkäse war lediglich bei zwei der sechs PCR-positiven Proben möglich. Dabei zeigte sich, dass ein CPE während der ersten Passage nicht unbedingt einem Vorhandensein oder einer Vermehrung von FSME-Viren entspricht. Häufig war weder direkt nach einer Sterilfiltration des Materials, noch in späteren Passagen ein CPE sichtbar oder Virus-RNA mittels qrt-PCR nachweisbar. Daher wurden vor jedem Anzuchtversuch drei Käsestücke mittels qrt-PCR auf FSME-Viren getestet und das Homogenat mit dem niedrigsten Ct-Wert zur Anzucht verwendet. Die Tatsache, dass dabei lediglich drei von zehn Proben (K5) positiv für FSME-Viren waren, erschwerte auch hier die Anzucht, da auch diese Proben im Verhältnis zu den Isolaten aus Zecken eine deutlich geringere Menge an FSME-Viren enthielten (höherer Ct-Wert). Eine mögliche Begründung dafür

könnte sein, dass Untersuchungen zur Ausscheidung von FSME-Viren bei Ziegen zeigten, dass verschiedene Individuen deutlich unterschiedliche Mengen an Viren ausscheiden können und dies auch über unterschiedlich lange Zeiträume tun (Balogh, et al., 2012). Zusätzlich konnte die Studie zeigen, dass die Menge an ausgeschiedenen Viren nicht nur zwischen den Individuen, sondern auch innerhalb der Ausscheidungsdauer stark variieren kann. Im Rahmen der Untersuchungen wurden fünf ungeimpfte Ziegen experimentell mit FSME-Viren infiziert und die von ihnen gegebene Milch während einer Dauer von 23 Tagen auf FSME-Viren untersucht. Die gleiche Anzahl geimpfter Ziegen diente als Kontrolle. Der Virusnachweis wurde einerseits durch eine FSME-Virus spezifische RT-PCR, andererseits durch zerebrale Inokulation von Babymäusen geführt. Dabei zeigte sich, dass eine der Ziegen bereits am zweiten Tag Viruspartikel in der Milch ausschied, während das Virus erst sechs Tage nach Infektion in der Milch zweier anderer Ziegen durch Inokulation nachweisbar war. Die Viruslast in den untersuchten Milchproben schwankte dabei teilweise sehr stark. So war die Menge an FSME-Viren in den Proben einer Ziege an Tag sechs etwa 18.000 Mal höher als am Folgetag. Andererseits zeigten die Proben eines anderen Tiers nur einen Ct-Wert-Unterschied von 2,4. Dies entspricht etwa einem Verhältnis von 1:0,76. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Balogh et al., zeigte die Forschungsgruppe Gresikova et al. im Jahr 1959, dass das FSME-Virus bei experimentell infizierten Ziegen ab dem zweiten Tag in der Milch nachweisbar ist. Die höchste Viruskonzentration konnte dabei nach vier Tagen nachgewiesen werden und nahm dann kontinuierlich ab (Satz, 2006).

Obwohl eine Isolierung der FSME-Viren aus dem Zeckenhomogenat nicht möglich war, wurde dennoch eine erfolgreiche Sequenzierung der Probe direkt aus dem Ausgangsmaterial durchgeführt um Daten für eine weitere Charakterisierung zu erhalten.

4.2.2.4.1. Zusätzliche Laborergebnisse der alimentären FSME-Untersuchungen am Standort Loretthof (Kooperation)

Insgesamt handelt es sich hierbei um den ersten Fall von alimentärer FSME in Deutschland der in dieser Form untersucht, nachverfolgt und aufgeklärt wurde. Bereits in den 1950er und 60er Jahren wurden Fälle von alimentär übertragener FSME in Fernost und Osteuropa, wo es auch heute noch häufiger zu Rohmilch assoziierten Ausbrüchen kommt, nachgewiesen (Levkovich, et al., 1958), (Popov, 1967), (Gresikova, et al., 1975) (Kohl, et al., 1996), (Süß, 2011). Von den bisher einzigen alimentär übertragenen Fällen von FSME in Deutschland wird von A. Helpert und H Sinnecker aus den Jahren 1960 und 1961 berichtet (Helpert, et al., 1966). Hierbei ist von 234 Fällen von FSME beim Menschen die Rede von denen 78 Serumpaarprouben untersucht wurden. Dabei konnte in 59 Fällen ein Anstieg des FSME-Antikörpertiters nachgewiesen werden. Es wurde allerdings kein Nachweis der FSME in Rohmilchprodukten geführt. Allerdings gaben die Patienten bei einer Befragung an, dass die Symptome nach dem Konsum von Kuh- und Ziegenmilch (-produkten), sowie teilweise nach Zeckenstichen aufgetreten seien.

Bei der Untersuchung der Ziegenserumproben des Loretthofs konnten in neun von 45 Proben neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich bei sieben der Seren niedrige Titer (1:15 – 1:40), die als länger zurückliegende Infektionen bewertet wurden. Allerdings wurden für zwei Seren hohe Antikörpertiter von mehr als 1:120 nachgewiesen, was für eine nur kurz zurückliegende Infektion spricht. Diese beiden Tiere kommen daher als Ausscheider von FSME-Viren während der Zeit des Ausbruchs in Betracht. Da in keinem der Seren Virus-RNA nachgewiesen wurde, kann eine akute Virämie zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei allen Ziegen der Herde ausgeschlossen werden. Es kann sich hierbei auch nicht um eine eingeschleppte FSME durch zugekaufte Tiere handeln, da der Ziegenhof nur dort geborene Tiere besitzt.

Ein Vergleich mit anderen alimentären FSME-Fällen zeigt, dass dieser Ausbruch nur einen geringen Umfang besitzt. Während sich in anderen Fällen mehr Personen infizierten und mit klinischen Symptomen stationär aufgenommen werden mussten (Süß, 2011), (Gresikova, et al., 1975) (Kriz, et al., 2009) waren es hierbei nur zwei Personen, obwohl an diesem Tag deutlich mehr Personen den Hof besuchten und Rohmilch(-produkte) konsumierten. Eine mögliche Begründung dafür könnte sein, dass die Infektionsdosis bei oraler Aufnahme von FSME-Viren bisher nicht bekannt ist und die in der Milch und dem Käse vorhandene Menge an infektiösen Viren zu gering war, um eine Infektion zu bewirken. Dies deckt sich mit den molekularbiologischen Untersuchungen der Käseproben (siehe 4.3.3.), bei denen nur in 20% bis 40% der nachgetesteten Proben FSME-Viren mit sehr hohe Ct-Werte nachgewiesen wurden. Des Weiteren ist bekannt, dass sich einzelne FSME-Virusisolate stark bezüglich ihrer Pathogenität und Infektiosität unterscheiden können (Dobler, et al., 2016). Daher sind weitere Untersuchungen nötig, um die Pathogenität des Virus zu bestimmen.

Die Ehefrau des Ziegenhofbesizers, die ebenfalls einen sehr hohen IgG-Antikörpertiter hatte, gab an, nie gegen FSME geimpft worden zu sein. Der Titer lässt sich daher lediglich durch eine natürliche Infektion erklären. Da sie sich an keinen Zeckenstich in den Jahren 2015 und 2016 erinnern konnte, ist es wahrscheinlich, dass auch sie sich irgendwann durch die Virusaufnahme mit der Nahrung infiziert hat. Überraschend dabei ist, dass sie, obwohl die orale Aufnahme von FSME-Viren als sehr effektive Infektionsroute gilt (Pogodina, 1960), (Gritsun, et al., 2003), keine Symptome entwickelte. Sie konnte sich auch an kein Fieber, weder mono-, noch biphasisch während der letzten Monate erinnern.

4.2.3. Charakterisierung der FSME-Viren

Die nachgewiesenen FSME-Viren sollten molekularbiologisch charakterisiert werden, sowie die phylogenetische Einordnung der bereits verfügbaren Isolate erweitert werden. Außerdem wurde das Wachstumsverhalten verschiedener Stämme in unterschiedlichen Zelllinien untersucht um Vergleiche bezüglich der Pathogenität anstellen zu können.

4.2.3.1. Molekularbiologische Charakterisierung und phylogenetische Einordnung von FSME-Viren

Die molekularbiologische Charakterisierung erfolgte anhand der Sequenzen der nachgewiesenen Viren. Dabei werden Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Virusisolaten eines Naturherds und zwischen Isolaten verschiedener Naturherde untersucht. Dies geschieht anhand von Sequenzanalysen des Hüllproteins (E-Protein), welches sehr wichtig für die Infektion der Wirtszellen, besonders für die Membranfusion ist (Mandl, et al., 2000). Die einfachste Unterteilung der FSME-Viren erfolgt in drei genetischen Linien, Subtypen genannt.

Im Osten Russlands und in Japan ist der fernöstliche Subtyp der FSME verbreitet (Lindquist, et al., 2008). Die intraspezifische Diversität innerhalb einzelnen Subtypen beträgt bis zu 2,2% auf Ebene der Aminosäuren und ist damit deutlich niedriger als die interspezifische Diversität zwischen den Subtypen. Diese beträgt bis zu 5,6% (Ecker, et al., 1999). Der fernöstliche und der europäische Subtyp sind näher miteinander verwandt (2,3-3,6%), als der sibirische Subtyp mit einem der anderen beiden Subtypen (3,8-5,6%). Auffällig ist dabei, dass die Varianz zwischen einzelnen Stämmen verschiedener Subtypen auf Ebene der Nukleotide bis zu 16,9% beträgt. Diese verhältnismäßig starke Konservierung der Aminosäuresequenz trotz einer so hohen Variabilität der Nukleotidsequenzen ist untypisch für RNA-Viren, da diese normalerweise eine hohe Mutationsrate besitzen, während das FSME-Virus zumindest innerhalb des Hüllproteins eine starke Konservierung aufweist. Dies weist vermutlich auf einen starken Selektionsdruck bei Mutationen innerhalb des E-Gens hin (Grard, et al., 2007), (Lindquist, et al., 2008). Da das E-Protein von größter Wichtigkeit für die Verschmelzung des Virus mit der Wirtszelle ist, erklärt dies den hohen Grad der Konservierung innerhalb der E-Proteinsequenz. Weidmann et al. zeigten im Jahr 2013 die hohe genetische Variabilität des Virus, auch im Vergleich zu

anderen zeckenübertragenen Pathogenen, innerhalb eines Standortes. Hier wurde Unterschiede von bis zu 5,2% auf Nukleotidebene nachgewiesen.

Innerhalb eines Subtyps sind die einzelnen Stämme dabei häufig in sogenannten Kladen oder Clustern organisiert. Die Gruppierung in Kladen zeigt an, dass die in den einzelnen Kladen enthaltenen Virusstämme mit hoher Wahrscheinlichkeit monophyletisch sind und auf einen gemeinsamen Ursprungsstamm zurückgehen. Eine Klade besteht dabei häufig aus mehreren Clustern, kleinen Untergruppen innerhalb einer Klade.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, dass Virusstämme, die aus Zecken eines Standortes isoliert wurden, nicht zwingend identisch sind. Diese Tatsache wurde auch bereits in anderen Arbeiten (Wessel, 2010), (Weidmann, et al., 2013) gezeigt. Die am Standort Emmendingen isolierten Viren zeigten dabei Unterschiede von null bis vier Nukleotiden bzw. maximal zwei Aminosäuren, während die am Standort Stuttgart Botnang isolierten Stämme nur zwei Nukleotide Unterschied zu einander aufwiesen, bzw. eine identische Aminosäuresequenz besaßen. Die Sequenz des Stammes SB N478 war hingegen vollkommen identisch mit den beiden älteren Stämmen Botnang B185 und Botnang H257, aus der FSME-Virus Stammsammlung des Landesgesundheitsamts Stuttgart. Die Unterschiede zwischen Sequenzen von verschiedenen Standorten waren mit 49 bis 64 Nukleotiden deutlich größer. Der Vergleich der Isolate mit Sequenzen aus der Gendatenbank (Genbank) zeigte die nächsten ähnlichen Sequenzen mit Unterschieden zwischen 11 und 51 Nukleotiden (Weidmann, et al., 2013). Der Abgleich der Sequenzen mit den Daten der Genbank soll eine zufällige Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen ausschließen. Zu diesem Zweck berechnet das Suchtool der Webseite einen e-Wert. Dabei gilt: Je niedrig der e-Wert, desto unwahrscheinlicher ist eine zufällige Übereinstimmung und je länger die Ausgangssequenz, desto niedriger der e-Wert. Bei den untersuchten Sequenzen also wie wahrscheinlich eine Übereinstimmung der Ausgangssequenz mit den erzielten Ergebnissen ist. Mit einer Länge von 1488bp sind die untersuchten Sequenzen verhältnismäßig lang, was sich entsprechend im e-Wert widerspiegelt. Dieser Wert war bei allen Datenabfragen so niedrig (z.B. $1,278 \cdot 10^{-9}$), dass er als null angesehen werden kann und somit eine zufällige Übereinstimmung der Sequenzen ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass die geographische Distanz zweier Naturherde nicht im Zusammenhang mit Abweichungen in der Nukleotidsequenz der dort nachweisbaren Viren steht. Obwohl zwischen den Standorten Stuttgart Botnang und Lorettohof nur etwa 64 Kilometer liegen, unterscheiden sich die Sequenzen in 51 Nukleotiden. Die Distanz zwischen dem Lorettohof und Zofingen beträgt 155 Kilometer, die aus den beiden Standorten isolierten Sequenzen unterscheiden sich aber nur in 11 Nukleotiden. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sind auch in der Literatur belegt (Weidmann, et al., 2011).

Um diese Charakterisierung weiter zu vertiefen wurden Stammbäume anhand der Sequenzen eigener Isolate sowie verschiedener Sequenzen aus der Gendatenbank und aus den Daten des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr berechnet (Dobler, 06.2017). Dabei wurden neben den Stämmen, die bei einem Abgleich mit der Gendatenbank die höchste Übereinstimmung zeigten (Joutseno, CGI223, Stamm 9001 und 9025, Dagmarsellen, Brittnau, Zofingen, A104, Vaslaty, 8641) auch ein Stamm einbezogen, der den Daten der Bundeswehr nach die größte Übereinstimmung mit den Sequenzen aus Emmendingen zeigte (DZIF17 1328 Tuebingen). Die Sequenzen von weiteren wichtigen Stämmen wurden in die Analysen mit aufgenommen (K23, Neudörfl, Hypr, Kolarovo, Zausaev, Sofjin, Primorye). Dabei zeichnet sich der Stamm K23 durch seine Verwendung als Impfstamm aus, während der Stamm Hypr als ausgesprochen pathogen gilt und 1953 aus dem Blut eines 10 Jahre alten Jungen isoliert wurde. Der Stamm Neudörfl aus Österreich findet ebenfalls als Impfstamm Verwendung und gilt darüber hinaus auch als Referenzstamm des europäischen Subtyps. Die beiden Stämme Kolarovo und Zausaev sind die Referenzstämme des sibirischen Subtyps, während die fernöstliche Linie durch die Stämme Sofjin und Primorye repräsentiert werden. Als

Außengruppe wurde einerseits eine Sequenz des Omsk hämorrhagischen Fiebervirus verwendet und andererseits das Louping-III Virus, welches eine Sonderstellung einnimmt. Diese besteht darin, dass sich die Sequenz des Louping III-E-Gens weniger stark von der des europäischen Subtyps des FSME-Virus unterscheidet, als sich dieser von den anderen beiden FSME-Linien.

Die Berechnung der Stammbäume erfolgte sowohl auf Basis der Nukleotid-, als auch auf Basis der Aminosäuresequenzen, da die Variabilität dieser Sequenzformate große Unterschiede aufweisen kann. Hierbei kamen das Maximum Parsimony (MP) und das Maximum Likelihood-Verfahren (ML) zum Einsatz. Die beiden verwendeten Berechnungsmethoden werden häufig in der Stammbaumberechnung bei FSME-Viren eingesetzt (Ecker, et al., 1999), (Gaunt, et al., 2001), (Jääskeläinen, et al., 2006). Da sich die Datenlage je nach untersuchter Sequenz deutlich unterscheiden kann und den beiden Methoden verschiedene Algorithmen zugrunde liegen, können sich berechnete Stammbäume stark unterscheiden. Je ähnlicher sich jedoch einzelne Bereiche verschiedener Stammbäume sind, desto besser spiegelt der dargestellte Ast die tatsächlichen Umstände wider. Um die Topologie der Stammbäume noch besser bewerten zu können wurden die Verfahren unter der Verwendung von Bootstraps durchgeführt. Dabei wird überprüft wie oft sich bei wiederholter Berechnung des Stammbaums bei minimalen Abweichungen innerhalb der Sequenzen die gleichen Äste finden lassen. Der prozentuale Anteil dieser Übereinstimmungen wird an den Kreuzungen der Stammbäume dargestellt. Hierbei sind Werte <70 als wenig verlässlich und Werte ≥ 80 als hoch signifikant anzusehen (Ecker, et al., 1999). Dabei lagen jeder Stammbaumberechnung 1000 Bootstrap-Wiederholungen zugrunde.

Die Sequenzen der Virusisolate aus Emmendingen werden in allen Stammbäumen als zusammengehöriges Cluster dargestellt. Die Klade wird in allen Stammbäumen am weitesten entfernt von den übrigen Subtypen eingeordnet. Ebenso finden sich die beiden Stämme Tübingen und A104 durchgehend in direkter Nachbarschaft. Die in der BLAST-Suche gefundenen Stämme Joutseno und CGI223 sind nicht Teil der Klade, werden jedoch in den anhand der Nukleotidsequenz berechneten Stammbäumen, sowie dem ML-aa-Stammbaum in direkte Nachbarschaft geordnet. Der Aminosäuresequenzstammbaum nach dem Maximum Parsimony Verfahren ordnet die beiden Stämme zwischen den Clustern Lorettohof und Stuttgart Botnang ein. Allerdings ist die Unterstützung dieser Einordnung durch Bootstrapwerte fast nicht gegeben (BT-Werte: 8 und 9). Die Positionierung der Stämme Joutseno und CGI223 wird allerdings auch in den anderen Stammbäumen nur sehr schlecht unterstützt (BT-Werte ≤ 44).

Die Isolate des Standorts Lorettohof (K5, LH W 89) bilden in allen berechneten Stammbäumen eine durch hohe Bootstrap-Werte (100) gestärkte Klade innerhalb des europäischen Subtyps. Ebenfalls zeigt sich durchgängig eine enge Verwandtschaft mit den Stämmen aus der Schweiz (BT-Werte ≥ 98). Auch in der Berechnung des Maximum-Parsimony Stammbaums auf Basis der Aminosäuresequenz liegen diese Stämme direkt beieinander, allerdings sind die hierbei auftretenden Bootstrap-Werte nicht hoch genug um sie als eigenes Cluster abzugrenzen. Lediglich in dem mittels MP-aa-Verfahren berechneten Stammbaum wird dieser Klade die größte Ähnlichkeit zu den anderen Subtypen zugerechnet. In den übrigen Fällen befindet sich das Cluster zwischen den Stämmen aus Stuttgart Botnang und Emmendingen.

In allen berechneten Stammbäumen bilden die Stämme aus Stuttgart Botnang eine gemeinsame Klade, die zusammen mit den Sequenzen der tschechischen Stämme aus der Gendatenbank clustert. Bemerkenswert ist hierbei besonders die in allen Stammbäumen außer dem MP-nn, vorhandene Unterstützung durch sehr niedrige Bootstrap-Werte ≤ 55 . Lediglich der MP-nn Stammbaum bietet hier eine Unterstützung von 100 an. Durchgängig erscheint der Stamm Neudörfel aus Österreich als nächster Verwandter, jedoch ist hierbei die Unterstützung durch Bootstrapwerte ≤ 47 zu niedrig um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

Insgesamt kann die Topologie der hier berechneten Stammbäume als realistisch angesehen werden, da sie auf Basis aller verwendeter Methoden identisch ist. Die Aufspaltung der Subtypen, sowie die Bildung der einzelnen Kladen und die Clusterbildung mit den verwandten Stämmen sind durchgängig identisch. Lediglich die Positionierung der zusätzlich verwendeten Referenzstämme des europäischen Subtyps zueinander ist in den unterschiedlichen Stammbäumen verschieden. Um diese zuverlässiger abbilden zu können wäre eine deutlich größere Anzahl an Sequenzen nötig, die jedoch die Übersichtlichkeit der Stammbäume zu stark beeinträchtigen würde.

Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Arbeiten, in denen zwar eine generelle Ausbreitung des europäischen Subtyps von Osten nach Westen gezeigt werden konnte (Zanotto, et al., 1995), (Weidmann, et al., 2011), (Fajs, et al., 2012), (Weidmann, et al., 2013), (Rieille, et al., 2014), ein Zusammenhang zwischen Herkunftsorten der Stämme und ihrer Distanz zueinander allerdings nicht vorhanden war. Auch die in dieser Arbeit erzeugten Sequenzen unterstützen die Erkenntnis von Weidmann et al. aus dem Jahr 2013, dass einzelne Einschleppungsereignisse der Viren in neue Gebiete, beispielsweise durch Zugvögel (Waldenström, et al., 2007), Füchse, Rotwild oder Rehwild deutlich wahrscheinlicher sind, als eine kontinuierliche Ausbreitung der Viren (Weidmann, et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für die Verbreitung von FSME-Viren stellt eine Hypothese von Waldenström et al. aus dem Jahr 2007 dar. Im Rahmen dieser Studie wurden in Schweden mehr als 13.000 Zugvögel untersucht und Zecken von ihnen abgesammelt. Dabei konnte in den Zecken von vier Vögeln, sowie in den Vögeln selbst, FSME-Viren nachgewiesen werden. Es wird daher angenommen, dass (Zug-) Vögel an der Verbreitung von FSME-Viren beteiligt sind.

Außerdem zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass die Ausdehnung des regulären Lebensraums der genannten Säugetiere zwar nicht groß genug ist, um eine Verbreitung über weitere Strecken zu ermöglichen (Rieger, et al., 1999), jedoch in Einzelfällen Füchse Distanzen von bis zu 73 km wandern können (Carter, et al., 1999). Dies trifft entsprechend auch auf Rot- und Rehwild zu, wobei diese, im Falle starker Nahrungsknappeit bis zu 67 km (Kropil, et al., 2015) respektive 84 km (Mysterud, 1999) zurücklegen. Auf diese Weise könnten Zecken die Distanzen zwischen einzelnen FSME-Makrofokussen überwinden und das Virus verbreiten. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe Weidmann et al. zeigen, dass das FSME-Virus während der letzten 300 Jahre mehrmals aus Deutschland und Österreich nach Tschechien eingeführt wurde, wobei auch der umgekehrte Weg von Tschechien nach Deutschland und Österreich, vermutlich während der 1930er Jahre sehr wahrscheinlich ist. Es konnte daher auch anhand der Daten dieser Arbeit gezeigt werden, dass kein Zusammenhang zwischen genetischer Verwandtschaft und der Distanz zwischen den Ursprungsorten der Virusisolate hergestellt werden kann. Eine Verbreitung der Viren durch die eigentlichen Reservoirwirte, die Nagetiere, lässt sich ausschließen, da diese einen zu geringen Aktionsradius haben um beispielsweise Distanzen von Emmendingen nach Tübingen zu überwinden.

Da bisher nur wenige Daten zur Aus- und Verbreitung sowie Verwandtschaft verschiedener FSME-Stämme innerhalb Deutschlands existieren, ist es nötig, weitere FSME-Naturherde in den Gebieten zwischen bereits bekannten Naturherden zu identifizieren und zu untersuchen, um durch eine bessere Datenlage mögliche Zusammenhänge erkennen zu können. Außerdem sollten die untersuchten Standorte auch weiterhin auf FSME-Viren in Zecken überprüft werden, um festzustellen, ob sich die Zusammensetzung der Klade ändert und beispielsweise benachbarte Stämme in die Klade integriert werden müssen. Des Weiteren wäre es interessant zu wissen, ob die Isolate aus Stuttgart Botnang auch in Zukunft keine Unterschiede untereinander aufweisen, oder ob beispielsweise einzelne Varianten des Virus in Emmendingen verloren gehen.

4.2.3.2. Wachstumsverhalten verschiedener FSME-Virusstämme in verschiedenen Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstumsverhalten fünf verschiedener FSME-Virusstämme in vier unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Dabei kamen renale Zelllinien (PK-Zellen und Vero B4), sowie Adenokarzinomzellen (A549) und Fibroblastenzellen (MA23 Zellen) zum Einsatz. Untersucht wurde das Wachstumsverhalten von vier Virusstämmen aus Baden-Württemberg und dem Stamm Hypr als Vergleichsstamm. Dieser wurde ausgewählt um sicherzustellen, dass ein hochpathogener Stamm untersucht wird. Die Arbeitsgruppe Wallner et al. zeigte 1996, dass FSME-Stämme deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Invasivität und Pathogenität aufweisen können. Die Stämme aus Baden-Württemberg stammen von den ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Standorten Emmendingen, Lorettohof und Stuttgart Botnang, sowie aus Gengenbach (Jahn, 2009). Der Stamm Gengenbach wurde verwendet, da er im Landesgesundheitsamt Stuttgart als Positivkontrolle bei Versuchen mit FSME dient. Die Untersuchungen zeigten, dass die Virusstämme abhängig von der verwendeten Zelllinie ein unterschiedliches Wachstumsverhalten besitzen. So vermehren sich die Stämme K5 (Lorettohof) und B185 (Botnang) in Vero B4-Zellen schneller als alle anderen Stämme und ebenfalls schneller als in den übrigen Zelllinien. Dahingegen zeigt der Stamm M7-5b (Gengenbach) in allen Zelllinien außer MA23 Zellen ein fast identisches Verhalten. Vergleicht man das Wachstumsverhalten der Virusstämme in renalen Zellen, so stellt man fest, dass sowohl der Stamm Hypr, als auch der aus Gengenbach keine Unterschiede aufweisen, während der Stamm K5 bereits 24 Stunden früher und der Stamm B185 bereits 96 Stunden früher sämtliche Zellen zerstört hat. Insgesamt zeigen alle untersuchten Virusstämme das stärkste Wachstumsverhalten in Vero B4-Zellen. Außerdem ist die Tatsache interessant, dass sich keiner der untersuchten Stämme in MA23-Zellen vermehrt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um Fibroblastenzellen handelt, die ein zumindest leicht alkalisches Milieu benötigen um zu überleben (van der Berg, 2016), während FSME-Viren nur bei einem pH-Wert von $\leq 6,6$ mit der zukünftigen Wirtszelle fusionieren können (Satz, 2006). Allerdings könnte auch die Tatsache, dass es sich bei der Zelllinie MA23 um eine semipermanente Zelllinie handelt einen Einfluss haben. Um Gewissheit zu erlangen sollte daher das Wachstumsverhalten weiterer FSME-Virusstämme in zusätzlichen Fibroblastenzelllinien untersucht werden.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den einzelnen Zelllinien in ihrer Gesamtheit, so zeigt sich, dass der in Stuttgart aus einer Zecke isolierte Stamm B185 und der Stamm K5, isoliert aus einer Käseprobe des Lorettohofs eine sehr hohe Virulenz besitzen, die mit der des Stammes Hypr vergleichbar ist. Der Stamm EN N858 aus Emmendingen scheint am wenigsten pathogen zu sein und konnte, außer in Vero B4-Zellen, in keiner Kultur den gesamten Zellrasen lysieren. Der Stamm aus Gengenbach ist bezüglich der Virulenz zwischen dem aus Emmendingen und den übrigen drei Stämmen einzuordnen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei den Stämmen M7-5b und Hypr bereits eine Anpassung an die Vermehrung in Zellkultur ohne Phasen in Zellen von Zecken in Form von Mutationen im Virusgenom, die die Infektiosität und Pathogenität beeinflussen, entstanden sein können. Die genaue Anzahl bereits durchlaufener Passagen in Säugetierzellen ist unbekannt. Verschiedene andere Studien konnten bereits zeigen, dass sich Flaviviren, zu denen auch das FSME-Virus gehört, durch mehrere Passagen sowohl innerhalb einer Wirtsspezies (Labuda, et al., 1994), als auch in der Zellkultur (Mitzel, et al., 2008) oder einem festen Wechsel zwischen diesen beiden (Romanova, et al., 2007), phänotypisch verändern und sich dabei an die Zelllinie bzw. den Wirt anpassen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die beiden Stämme ursprünglich eine höhere Pathogenität und Infektiosität besaßen.

Es sollten weiter Untersuchungen zum Wachstumsverhalten in verschiedenen Zelllinien durchgeführt werden, um herauszufinden inwiefern die Wahl der Zelllinie hier einen Einfluss hat.

4.2.3.3. Neutralisationstest FSME-Viren

Da die Kenntnis um den FSME-Mikrofokus Stuttgart Botnang auf eine humane Infektion zurückgeht, wurden zusätzlich Serumproben der Gartenbesitzer, sowie zum Vergleich von drei Personen mit vollständiger FSME-Immunsierung, einer Person mit einer ersten Impfdosis und einer Person ohne FSME-Immunsierung, dafür mit Gelbfieberimpfung, mittels Neutralisationstest auf neutralisierende Antikörper gegen FSME untersucht.

Es waren in zwei der untersuchten Seren keine neutralisierenden Antikörper nachweisbar. Hierbei handelt es sich um die Proben S2 und S5. Die Probe S2 stammt von einer Person, die zwar bereits gegen andere Flaviviren (Gelbfieber) geimpft wurde, jedoch keine FSME-Impfung bekommen und auch erinnerlich keine FSME-Infektion hatte. Die Person, von der Serum S5 stammt, war bisher auch nicht erinnerlich mit FSME-Viren infiziert und hatte acht Wochen vor Entnahme der Blutprobe die erste der drei Impfungen der FSME-Grundimmunsierung bekommen. Diese beiden Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, dass ungeimpfte Personen bzw. Personen mit nur einer Impfung keinen Schutz vor einer Infektion besitzen. Den höchsten Antikörpertiter weist das Serum S4 mit $>1:640$ auf und stammt von einer Person, die sowohl eine Grundimmunsierung, als auch Boosterimpfungen bekommen hat. Die letzte Boosterimpfung liegt allerdings bereits deutlich über ein Jahr zurück. Daher erscheint ein so hoher Antikörpertiter überraschend, besonders im Vergleich zu den Serumproben S1, S3 und S7. Das Serum S7, welches von einer Person mit durchgemachter FSME-Infektion stammt, weist mit $1:640$ den zweithöchsten Titer auf. Auch dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da sich die Person im Jahr 1988 mit FSME durch einen Zeckenstich im eigenen Garten infizierte und eine so erworbene natürliche Immunität mit deutlich höhere Antikörpertiter einhergeht, die auch noch Jahre später unverändert nachweisbar sind (Baldovin, et al., 2012). Die Seren S1 und S3 stammen von Personen, die zwar grundimmunsiert und auch mindestens 2 Auffrischimpfungen, jedoch keine erinnerliche FSME-Infektion hatten. Die hier nachgewiesenen Antikörpertiter sind deutlich niedriger ($1:40$ und $1:80$). Es ist daher anzunehmen, dass das Serum 4 von einer Person stammt, die zusätzlich zu den Impfungen auch auf natürlichem Weg mit FSME infiziert wurde, wodurch sich der hohe Titer neutralisierender Antikörper erklären ließe. Serum 6 stammt von einer Person, die zusammen mit Person 7 lebt und den gemeinsamen Garten nutzt. Da diese Person zwar geimpft ist und auch regelmäßig die Auffrischimpfungen durchführt, der Titer allerdings deutlich höher als bei den anderen beiden geimpften Personen (S1, S3) ist, wäre auch hier eine natürliche Infektion mit FSME-Viren als Begründung denkbar. Nur Person 5 wurde innerhalb der letzten Monate gegen FSME-Viren geimpft, sodass ein impfbedingter, kurzfristiger Anstieg der Antikörper bei allen Personen ausgeschlossen werden kann und die in dieser Arbeit ermittelten Neutralisationstiter als langfristig wirksam angesehen werden können. Außerdem zeigt sich deutlich, dass Impfungen gegen andere Flaviviren nicht zwangsläufig zu einem höheren Antikörpertiter gegen FSME-Viren führen. Dabei ist zu beachten, dass verschiedene Studien eine Kreuzreaktivität innerhalb der Flaviviren zeigten (de Madrid, et al., 1974). 1989 wies eine Forschungsgruppe um Charles H. Calisher eine starke Kreuzreaktion der neutralisierenden Antikörper verschiedener Viren aus der Gruppe der zeckenübertragenen Enzephalitisviren-Antikörpergruppe nach. Kreuzreaktionen ohne Schutzwirkung zwischen Flaviviren verschiedener Antikörpergruppen konnten bisher sowohl in Immunofluoreszenztests, ELISAs, als auch für Hämagglutinationstests nachgewiesen werden (Holzmann, et al., 1996), (Holzmann, 2003). Lediglich der Neutralisationstest stellt eine zuverlässige Möglichkeit dar, um die Wirksamkeit einer FSME-Impfung bzw. mittels anderer Methoden nachgewiesener FSME-Antikörper zu bestätigen (Holzmann, 2003).

5. Zusammenfassung:

Die Frühsommer-Meningoenzephalitis ist die häufigste zeckenübertragene, virale Erkrankung in Deutschland. Der Erreger aus der Familie der Flaviviren kann dabei entweder direkt durch eine Zecke, oder indirekt alimentär übertragen werden. Als Reservoirwirt dienen dem FSME-Virus Nagetiere wie beispielsweise Gelbhalsmäuse oder Rötelmäuse. Letztgenannte sind außerdem Reservoirwirte des nagetierassoziierten Hantavirus, welches hauptsächlich durch eingeatmete Aerosole aufgenommen wird. Das Virus ist besonders in Süddeutschland stark verbreitet und die gemeldeten humanen Fallzahlen weisen annuelle Schwankungen ähnlich der der FSME-Fälle auf. Um die von diesen Erregern ausgehende Gefährdung für den Menschen besser einschätzen zu können sind umfangreiche Daten bezüglich der Epidemiologie und der Verbreitung sowie die Viren selbst nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Auftreten von FSME-Naturherden, sowie die Existenz von Mikro- und Makrofokussen untersucht.

Zu diesem Zweck wurden 15483 Zecken an vier verschiedenen Standorten, die meisten der Art *Ixodes ricinus*, mittels der Flaggmethode gefangen. Dabei konnte anhand der Eingrenzung des Mikrofokus am Standort Emmendingen Neumattengraben auf etwa 2,1 ha, gezeigt werden, dass dieser kleiner ist, als von Pretzmann et al (1963) angenommen wird, der von 5 ha ausging. Die Prävalenz von 0,51% ist vergleichbar mit den Prävalenzen, die in anderen Studien nachgewiesen wurden (Han, et al., 2005), (Kupca, et al., 2010), (Aspöck, 2010).

Am Standort Lauterbach wurde versucht einen FSME-Fokus anhand eines humanen Erkrankungsfalls zu identifizieren. Dies war trotz detaillierter Informationen durch den Patienten nicht möglich und so auch bereits in anderen Studien T (Süß, et al., 1992), (Frimmel, et al., 2014) geschehen.

Der Standort Stuttgart-Botnang ist ein schon lange bekannter FSME-Fokus. Im Untersuchungszeitraum wurden 2790 Zecken untersucht. Keine der 2015 eingesammelten 533 Zecken war FSME-positiv und nur in zwei Nymphen der 2257 im Jahr 2016 geflaggt Zecken konnten FSME Viren nachgewiesen werden. Da Nagetiere eine wichtige Rolle als Reservoirwirte für FSME Viren spielen, wurden in den Jahren 2015 und 2016 insgesamt 245 Milzproben und Gehirnproben untersucht, um die Prävalenz des FSME Virus in Nagetieren zu untersuchen. Der Nachweis war in allen Proben negativ.

Nach dem Auftreten zweier humaner Erkrankungsfälle mit FSME-Viren am Standort Lorettohof, bei denen ein alimentärer Infektionsweg vermutet wurde, wurden 407 dort geflaggte *I. ricinus*, sowie 23 Rohmilchprodukte des Hofes auf FSME-Viren getestet. Der Nachweis war in einem Zeckenweibchen, sowie sechs Rohmilchprodukten erfolgreich

Alle gewonnenen FSME-Virusisolate wurden molekularbiologisch charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet. Zu diesem Zweck wurde das E-Gen der positiven Proben sequenziert und verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich Isolate eines Standortes in bis zu vier Nukleotiden bzw. zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden. Dies deckt sich mit anderen Studien, in denen Nukleotidunterschiede von bis zu 5,2% innerhalb eines Standortes nachgewiesen wurden (Ecker, et al., 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Anzahl an Nukleotidaustauschen zweier Stämme keinen Rückschluss auf die Distanz zwischen den FSME-Standorten zulässt. Auch dies deckt sich mit anderen Studien (Weidmann, et al., 2011). Zur weiteren Vertiefung wurden Stammbäume erstellt um die Verwandtschaft der Isolate untereinander und mit verschiedenen anderen (Referenz-) Stämmen zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine typische Kladen- und Clusterbildung. Die vom Standort Emmendingen isolierten Stämme zeigen dabei die größte Ähnlichkeit mit Sequenzen aus Tübingen und Tschechien, während die Stämme vom Lorettohof die größte Übereinstimmung mit Sequenzen aus Österreich und der Schweiz besitzen. Auch hier bildeten die Sequenzen aus Käse und Zecke ein gemeinsames Cluster. Die Stämme aus Botnang bilden ebenfalls eine gemeinsame

Untergruppe und stehen benachbart zu Stämmen aus Tschechien. Insgesamt passt dies zur Theorie einer Verbreitung der FSME-Viren von Tschechien aus über Deutschland, Österreich, die Schweiz und Polen.

Weiterführend wurde das Wachstumsverhalten der Isolate aus Botnang, Emmendingen, dem Lorettohof mit dem als hochpathogen geltenden Stamm Hypr und dem Kontrollstamm des Landesgesundheitsamts Stuttgart, isoliert in Gengenbach, in verschiedenen Zelllinien (PK-Zellen, VeroB4, A549 und MA23) untersucht. Dabei zeigten die Stämme aus dem Gebiet Lorettohof und Botnang das stärkste Wachstum, vergleichbar mit der des Stamms Hypr. Dies deckt sich auch mit den zugrundeliegenden humanen Erkrankungsfällen, die alle sehr schwer verliefen. Grundsätzlich unterschied sich das Wachstumsverhalten aller Stämme zwischen den Zelllinien, wobei der Kontrollstamm des LGA die geringsten Unterschiede aufwies. Das Wachstum war durchgängig in VeroB4-Zellen am stärksten, während keiner der Virusstämme in MA23-Zellen anwachsen konnte. Des Weiteren wurde ein Neutralisationstest mit FSME-Viren und mit Serumproben verschiedener Personen durchgeführt. Die Seren stammten dabei sowohl von einer früheren FSME-Patientin aus dem Standort Stuttgart Botnang, sowie von 3 Personen mit FSME-Grundimmunisierung und mit mindestens einer Boosterimpfung. Zusätzlich wurde eine Person ohne FSME-Impfung, dafür mit Gelbfieberimpfung, sowie eine Person mit einer ersten Impfung der Grundimmunisierung getestet. Dabei zeigte sich, dass die Person mit natürlich erworbener FSME-Immunität den zweithöchsten Antikörpertiter aufweist (1:640), während der höchste Titer bei einer der beiden komplett geimpften Personen nachgewiesen wurde (>1:640).

Um die Prävalenz von Hantaviren in Nagetieren zu bestimmen, wurden 123 Lungenproben der Mäuse aus Botnang molekularbiologisch untersucht. Dabei wurde in 78,5% aller Lungengewebsproben Viren des Puumala-Typs nachgewiesen. Alle positiv getesteten Proben stammten von Rötelmäusen (*Myodes glareolus*), woraus sich eine Prävalenz von 93,75% im Jahr 2015 ergibt, während es im Jahr 2016 nur 44% waren (11 von 25 Proben).

6. Summary:

Tick-borne encephalitis (TBE) is the most common tick-borne viral infection in Germany. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) belongs to the family Flaviviridae and is transmitted either directly by tick bites or by the alimentary route, which means by contaminated food. The main reservoir hosts of TBEV are the yellow-necked mouse and the bank vole, which is also the main reservoir host for the rodent-borne Hanta viruses. Infections with Hanta virus are mainly acquired by inhaling of aerosols of urine and faeces of infected individuals. The most common type of Hanta viruses in Southern Germany is the Puumala type. Hanta-virus infections as well as TBE infections are notifiable diseases in Germany. For both diseases the amount of registered cases per year vary between years in a contrary pattern. To be able to evaluate possible risks of TBEV for humans, it is very important to know detailed information about the epidemiology, spreading of the viruses, as well as their hosts and the viruses themselves. Therefore, the presence of TBEV-foci, as well as the breakdown into micro- and macrofoci was addressed.

Consequently 15483 ticks, predominantly *Ixodes ricinus*, were collected by flagging along four different sites in Baden-Wuerttemberg. By limitation of the survey area at the site Emmendingen Neumattengraben to about 2,1 ha, it was possible to show that TBEV micro foci might be smaller than estimated by Pretzmann et al. (1963) who assumed 5ha to be the minimal size. The detected prevalence of 0.51% in ticks was within the range which was demonstrated by other studies (Han, et al., 2005), (Kupca, et al., 2010), (Aspöck, 2010).

The site Lauterbach was chosen to try to identify a TBEV hotspot using patient information. Despite detailed information given by the patient the identification of the hotspot was not successful. This situation is already described in other studies (Süß, et al., 1992), (Frimmel, et al., 2014).

The site Stuttgart Botnang is known as a TBE-foci for many years. Two nymphs out of 2257 ticks collected in 2016 were tested positive for TBEV, whereas no TBEV was detectable in any of the 533 ticks in 2015. As rodents play a major role as reservoir hosts for TBEV, 245 samples of spleen and brain tissue were tested for TBEV to determine the prevalence in rodents. No TBEV was detected in any of these samples.

After a report about two human cases of TBEV-infection, probably acquired by the alimentary route, 407 ticks were flagged at the site Lorettohof. Additionally, samples of unpasteurized raw dairy products were taken at the goat farm. The virus was detectable in one female *I. ricinus* tick and six out of 23 unpasteurized dairy products.

All acquired TBEV-isolates were molecular biologically characterized and classified phylogenetically. This was done by sequencing of the E-gen and comparison with already known sequences. It was shown, that sequences from a single testing site differed in up to four nucleotides respectively one amino acid. Phylogenetic trees were constructed to study the relationship between those identified virus isolates and different (reference) strains. The sequences of Emmendingen revealed a high homology with virus strains isolated from a hot spot in Tübingen and the Czech Republic, whereas the isolates from the site Lorettohof are closely related to sequences from Austria and Switzerland. In this clade the strains acquired from the tick and cheese samples form a common cluster.

Additionally, the sequences from Botnang are also located in a single cluster and they are closely related to virus strains from Czech Republic. This fits a theory about the spreading of TBEV from the Czech Republic to Germany, Austria, Switzerland and Poland. Furthermore, the growth behavior of the TBEV isolates from Botnang, Emmendingen and Lorettohof were compared to the pathogenic strain Hypr as well as to the control strain used at the Landesgesundheitsamt Stuttgart, isolated near Gengenbach. These experiments were done in different cell lines (PK-cells, VeroB4, A549 and MA23). The isolates from Lorettohof and Botnang exhibited to fastest growth rates, comparable to the strain Hypr. These results correlate with the severe course of TBE in the patients. Essentially, the growth behavior of all strains differs between cell lines, although the control strain from Gengenbach

showed the least differences. All virus isolates showed the highest growth rate in VeroB4-cells, whereas no virus replication was detectable in MA23 cells.

Additionally, TBEV-neutralization tests were carried out with sera from different persons to test the difference in immunity naturally acquired or by vaccination. One was a former TBE patient from Botnang, three other persons had been vaccinated at least four times. Additionally, the sera of one person without TBE vaccination but with a yellow fever vaccination, and another person, who had received only one dose of TBEV vaccine. The tests revealed, that the second highest number of antibodies could be found within the serum of the naturally infected person from Botnang (1:640), whereas the highest titer was shown for a person with 4 doses of vaccine (>1:640)

To determine the prevalence of Hanta virus in rodents, 123 samples of lung tissue from Stuttgart Botnang were tested by means of molecular biology for Hanta virus. 78.5% of all pulmonary tissue samples were tested positive for Puumala virus. All positive samples originated from bank voles (*Myodes glareolus*) and no infections were detected in other rodent species. There is a huge difference between the year 2015 and 2016. The prevalence of Hantavirus in rodents was 93.75% of all samples taken in 2015, but only 44% of the samples from 2016.

Literaturverzeichnis

- Achazi, K., et al. 2011.** Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011, Bd. 11, 6.
- Arthur, Don R. 1963.** *British Ticks*. s.l. : BUTTERWORTHS, 1963.
- Aspöck, Horst (Hrsg.). 2010.** *Denisia 30 Krank durch Arthropoden*. s.l. : Biologiezentrum der Oberösterreichischen Landesmuseen Linz, 2010.
- Atamer, Z., et al. 2009.** Screening for and characterization of Lactococcus lactis bacteriophages with high thermal resistance. *International Dairy Journal*. 2009, 19.
- Avsic-Zupanc, T., Saksida, A. und Korva, M. 2016.** Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016, Bd. 1, 11.
- Baldovin, T., et al. 2012.** Persistence of immunity to tick-borne encephalitis after vaccination and natural infection. *Journal of Medical Virology*. 2012, Bd. 84, 8.
- Balogh, Z., et al. 2012.** Experimental Infection of Goats with Tick-Borne Encephalitis Virus and the Possibilities to Prevent Virus Transmission by Raw Goat Milk. *Intervirology*. 2012, Bd. 55.
- Balogh, Z., et al. 2010.** Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of Virological Methods*. 2010, Bd. 2, 163.
- Benoit, Joshua B., et al. 2008.** The seabird tick, Ixodes uriae, uses uric acid in penguin guano as kairomone and guanine in tick feces as an assembly pheromone on the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*. 2008, S. 31: 1445-1451.
- Bertram, pers. Kommunikation, Rudolf. 2017.** Stuttgart Botnang : s.n., 2017.
- Bi, Zhenqiang, Formenty, Pierre B.H. und Roth, Cathy E. 2008.** Hantavirus Infection: a review and global update. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2008, Bd. 2, 1.
- Brockmann, S., et al. in press.** First outbreak of tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurized goat cheese in Germany, June 2016. *Eurosurveillance*. in press, eingereicht.
- Brunner, J. L. und Ostfeld, R. S. 2008.** Multiple Causes of Variable Tick Burdens on Small-Mammal Hosts. *Ecology*. 2008, Bd. 89, 8.
- Burkhardt, J. F. und Schlund, W. 2005.** Rötelmaus Clethrionomys glareolus. [Buchverf.] M. Braun und F. Dieterlen. *Die Säugetiere Baden-Württembergs Band 2*. s.l. : Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005.
- Caini, S., et al. 2012.** Tick-Borne Encephalitis Transmitted by Unpasteurized Cow Milk in Western Hungary, September to October 2011. *Eurosurveillance*. 2012, Bd. 12, 17.
- Calisher, C. H., et al. 1989.** Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *Journal of General Virology*. 1989, Bd. 70.
- Carter, J. und Finn, J. T. 1999.** MOAB: a spatially explicit, individual-based expert system for creating animal foraging models. *Ecological Modelling*. 1999, 199.
- Casati, S., Gern, L. und Piffaretti, J.-C. 2006.** Diversity of the population of Tick-borne encephalitis virus infecting Ixodes ricinus ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *Journal of General Virology*. 2006, 87.

- Danielova, V. und Holubova, J. 1991.** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Modern Acarology*. Prag : s.n., 1991.
- Dautel, H., et al. 2006.** Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *International Journal of Medical Microbiology*. 2006, 296 (1).
- Davis, S., Calvet, E. und Leirs, H. 2005.** Fluctuating Rodent Populations and Risk to Humans from Rodent-Borne Zoonoses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2005, Bd. 5, 4.
- de Madrid, A. T. und Porterfield, J. S. 1974.** The Flaviviruses (Group B Arboviruses): a Cross-neutralization Study. *Journal of General Virology*. 1974, Bd. 23.
- Dieterlen, F. 2005 (a).** Ordnung Nagetiere (Rodentia). [Buchverf.] Monika Braun/Fritz Dieterlen (Hrsg.). *Die Säugetiere Baden-Württembergs*. s.l. : Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005 (a).
- **2005 (b).** Wanderratte *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). [Buchverf.] M. Braun und F. Dieterlen. *Die Säugetiere Baden-Württembergs Band 2*. s.l. : Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005 (b).
- Dobler, G. 06.2017.** pers. Komm. *Sequenzdaten verschiedener FSME-Stämme*. 06.2017.
- **05.2017.** pers. Komm. 05.2017.
- **03.2017.** pers. Komm. 03.2017.
- Dobler, G., et al. 2016.** Complete Genome Sequence of a Low-Virulence Tick-Borne Encephalitis Virus Strain. *Genome Announcements*. 2016, Bd. 4, 5.
- Dobler, G., et al. 2011.** Tick-Borne Encephalitis: From Microfocus to Human Disease. [Hrsg.] H. Mehlhorn. *Progress in Parasitology*. 2011.
- Drehmann, Marco A. 2016.** Die Gartenstudie - Untersuchungen zur Zeckendichte und Pathogenprävalenz in ausgewählten Gärten Baden-Württembergs. *Masterarbeit*. 2016.
- Dumpis, U., Crook, D. und Okis, J. 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Disease*. 1999, 28.
- Ecker, M., et al. 1999.** Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*. 1999, 80.
- Eistetter, S., Kimmig, P. und Oehme, R. 1998.** Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME in Baden-Württemberg. *Bundesgesundheitsblatt*. 1998, Bd. 41, 2.
- Escutenaire, S., et al. 2002.** Behavioral, physiologic, and Habitat Influences on the Dynamics of Puumala virus Infection in Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases*. 2002, Bd. 8, 9.
- Essbauer, S., et al. 2006.** A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of Nephropathia epidemica in South-East Germany in 2004. *Epidemiology and Infection*. 2006, Bd. 134, 6.
- Estrada-Peña, A., et al. 2005.** Hosts and Pathogen Detection for Immature Stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Experimental & Applied Acarology*. 2005, 3-4.
- Frey, S., et al. 2014.** Full genome sequences and preliminary molecular characterization of three tick-borne encephalitis virus strains isolated from ticks and a bank vole in Slovak Republic. *Virus Genes*. 2014, Bd. 14, 1.

- Frimmel, S., et al. 2014.** Tick-Borne Encephalitis Virus Habitats in North East Germany: Reemergence of TBEV in Ticks after 15 Years of Inactivity. *BioMed Research International*. 2014, Bd. Article ID 308371.
- Gäumann, R., et al. 2010.** High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, Bd. 76, 13.
- Gaunt, M. W., et al. 2001.** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*. 2001, Bd. 82.
- Genbank, NCBI.** Basic Local Alignment Search Tool, Blast. [Online] National Center for Biotechnology Information.[Zitat vom: 12. 04 2017.]
- Google.** Google Maps. [Online] Google.[Zitat vom: 31. 03 2017.] www.maps.google.de.
- Grard, G., et al. 2007.** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*. 361, 2007, 1.
- Gresikova, M., et al. 1975.** Sheep Milk-Borne Epidemic of Tick-Borne Encephalitis in Slovakia. *Intervirology*. 1975, 5.
- Gresikova-Kohutova, M. 1959.** The effect of heat on infectivity of the tick-borne encephalitis virus. *Acta Virologica*. 1959, 3.
- Grimm & Tierley, pers. Komm., U. & M. 2016.** persönliche Kommunikation. 2016.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A. und Gould, E. A. 2003.** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*. 2003, 57.
- Guglielone, Alberto A., et al. 2010.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalielidae (Acari: Ixodida) of the world: a list auf valid species names. *Zootaxa*. 6. Jul. 2010, S. 1-28.
- Haglund, M., et al. 2003.** Characterisation of Human Tick-Borne Encephalitis Virus From Sweden. *Journal of Medical Virology*. 2003, 71.
- Han, X., et al. 2005.** Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Ixodes ricinus ticks in Lithuania. *Journal of Medical Virology*. 2005, Bd. 77, 2.
- Hellwig, H.-J. 2009.** Wikipedia. *Wikipedia*. [Online] 26. 10 2009. [Zitat vom: 31. 03 2017.] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/10/Co-swand-09-12.jpg>.
- Helpert, A. und Sinnecker, H. 1966.** Ausgewählte Erhebungen zur Zeckenenzephalitis-Epidemie im Kreis Niesky, Bezirk Dresden 1961. *Dt. Gesundheitswesen*. 1966, 21.
- Hiatt, C. W. 1964.** Kinetics of the inactivation of viruses. *Bacteriological Reviews*. 1964, 28.
- Hillyard, Paul. 1996.** *Ticks of north-west Europe*. s.l. : Field Studies Council, 1996.
- Holzmann, H. 2003.** Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*. 2003, Bd. 21.
- Holzmann, H., et al. 1996.** Correlation Between ELISA, Hemagglutination Inhibition, and Neutralization Tests After Vaccination Against Tick-Borne Encephalitis. *Journal of Medical Virology*. 1996, Bd. 48.
- Holzmann, H., et al. 2009.** Tick-borne Encephalitis from Eating Goat Cheese in a Mountain Region of Austria. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, Bd. 15, 10.

- Humair, P.-F., et al. 1993.** Ixodes ricinus immatures on birds in a focus of Lyme borreliosis. *Folia Parasitologica*. 1993, 40.
- Jääskeläinen, A. E., et al. 2006.** Siberian Subtype Tickborne Encephalitis Virus, Finland. *Emerging Infectious Diseases*. 2006, Bd. 12, 10.
- Jahn, F. 2009.** Epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz von FSME-Viren in Ixodes ricinus in Baden-Württemberg. *Diplomarbeit im Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*. Hohenheim : s.n., 2009.
- Kaiser, R. 1999.** The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98. *Brain*. 1999, 122.
- . **2008.** Tick-Borne Encephalitis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2008, 22.
- Kim, Su-Yeon, et al. 2008.** Isolation of Tick-Borne Encephalitis Viruses from Wild Rodents, South Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2008, Bd. 8, 1.
- Kimmig, P., Hassler, D. und Braun, R. 2001 (a).** *Zecken: Kleiner Stich mit bösen Folgen*. s.l. : MVS Medizinverlage Stuttgart, 2001 (a).
- Kimmig, Peter, et al. 2001 (b).** Epidemiologie von Hantaviren in Baden-Württemberg. *Gesundheitswesen*. 2001 (b), Bd. 63 (2), S. 107-112.
- Kinström, J., et al. 2002.** Rodent host specificity of European hantaviruses: Evidence of Puumala virus interspecific spillover. *Journal of Medical Virology*. 68, 2002, 4.
- Klempa, Boris, et al. 2012.** Sangassou Virus, the First Hantavirus Isolate from Africa, Displays Genetic and Functional Properties Distinct from Those of Other Murinae-Associated Hantaviruses. *Journal of Virology*. 2012, Bd. 86, 7.
- Ko, S., et al. 2010.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in ticks from southern Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2010, Bd. 11, 3.
- Kohl, I., et al. 1996.** Family outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Slovakia associated with a natural focus of infection. *European Journal of Epidemiology*. 1996, 12.
- Kohl, O., et al. 1996.** Family outbreak of alimentary tick-borne encephalitis in Slovakia associated with a natural focus of infection. *European Journal of Epidemiology*. 1996, Bd. 12, 4.
- Korenberg, E. I. 2000.** Seasonal population dynamics of ixodes ticks and tick-borne encephalitis virus. *Experimental & Applied Acarology*. 2000, Bd. 24, 9.
- Kriz, B., Benes, C. und Daniel, M. 2009.** Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie : Casopis Spolecnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti*. 2009, Bd. 58, 2.
- Kropil, R., Smolko, P. und Garaj, P. 2015.** Home range and migration patterns of male red deer Cervus elaphus in Western Carpathians. *European Journal of Wildlife Research*. 2015, 61.
- Krüger, D. H. 2009.** Hantaviren. [Buchverf.] B. Neumeister, et al. *Mikrobiologische Diagnostik*. 2. Auflage. 2009.
- Krüger, Detlev H., Ulrich, Rainer G. und Hofmann, Jörg. 2013.** Hantaviruses as Zoonotic Pathogens in Germany. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2013, Bd. 110, 27-28.

- Kupca, Anna M., et al. 2010.** Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1, 2010.
- Labuda, M., et al. 1994.** Change in phenotype of tick-borne encephalitis virus following passage in *Ixodes ricinus* ticks and associated amino acid substitution in the envelope protein. *Virus Research*. 1994, 31.
- Labuda, M., et al. 1997.** Tick-Borne Encephalitis Virus Transmission between Ticks Cofeeding on Specific Immune Natural Rodent Hosts. *Virology*. 1997, Bd. 235.
- Lednicky, John A. 2003.** Hantaviruses - A short review. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2003.
- Lee, Ho Wang und van der Groen, G. 1989.** Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Progress in Medical Virology*. 1989.
- Lee, Ho Wang, Baek, Luck Ju und Johnson, Karl M. 1982.** Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *The Journal of infectious disease*. 1982.
- Levkovich, E. N. und Pogodina, V. V. 1958.** The Alimentary Route of Infection in Tick-Borne Encephalitis. *Problems of Virology*. 1958, Bd. 3, 3.
- Leysen, P., Clercq, E. und Neytis, J. 2000.** Perspectives for the Treatment of Infections with Flaviviridae. *Clinical Microbiological Reviews*. 2000, 13.
- Lindau, Alexander. 2013.** Epidemiologische Untersuchungen an *Ixodes ricinus*. *Masterarbeit*. Stuttgart Hohenheim : s.n., 2013.
- Lindgren, E., Tälleklint, L. und Pofeldt, T. 2000.** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting european tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives*. 2000, Bd. 2, 108.
- Lindquist, Lars und Vapalahti, Olli. 2008.** Tick-borne encephalitis. *The Lancet*. 2008, 371.
- Lucius, Richard und Loos-Frank, Brigitte. 2008.** *Biologie von Parasiten*. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2008.
- Lundkvist, A., et al. 2001.** Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus From Latvia: Evidence for Co-Circulation of Three Distinct Subtypes. *Journal of Medical Virology*. 2001, 65.
- Mandl, C. W., et al. 2000.** Attenuation of Tick-Borne Encephalitis Virus by Structure-Based Site-Specific Mutagenesis of a Putative Flavivirus Receptor Binding Site. *Journal of Virology*. 2000, Bd. 74, 20.
- Manilla, G. . 1998.** *Fauna d'Italia Vol. XXXVI - Acari, Ixodida*. Bologna : Calderini, 1998.
- Mansfield, K. L., et al. 2009.** Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*. 2009, 90.
- Martin, Mary Lane, et al. 1985.** Distinction Between Bunyaviridae Genera by Surface Structure and Comparison with Hantaan Virus Usin 9 Neflative Stain Electron Microscopy. *Archives of Virology*. 1985.
- Martinez, Valeria P., et al. 2005.** Person-to-Person Transmission of Andes Virus. *Emerging Infectious Diseases*. Dezember 2005, S. 1848-1853.

- Mills, J. N., et al. 1999.** Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging Infectious Diseases*. 1999, Bd. 5.
- Mitzel, D. N., et al. 2008.** Identification of genetic determinants of a tick-borne flavivirus associated with host-specific adaptation and pathogenicity. *Virology*. 2008, 381.
- Mysterud, A. 1999.** Seasonal migration pattern and home range of roe deer (*Capreolus capreolus*) in an altitudinal gradient in southern Norway. *Journal of Zoology*. 1999, 247.
- Nosek, J., Kozuch, O. und Mayer, V. 1978.** Spatial distribution and stability of natural foci of tick-borne encephalitis virus in Central Europe. *Sitzungsberichte der Heidelberger Akademie der Wissenschaften*. 1978, 2.
- Oehme, R. 2016.** pers. Komm. Stuttgart : s.n., 2016.
- **2013.** pers. Komm. Stuttgart : s.n., 2013.
- Oehme, R., et al. 2002.** Foci of tick-borne diseases in Southwest Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 2002, Bd. Suppl. 33.
- Offerdahl, D. K., Clancy, N. G. und Bloom, N. E. 2016.** Stability of a Tick-Borne Flavivirus in Milk. *frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2016, Bd. 4, 40.
- Oliver, James H. Jr. 1989.** Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1989, 20.
- Överby, A. K., et al. 2010.** Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles. *Journal of Virology*. 2010, Bd. 84, 17.
- Petersson, J. H.-O., et al. 2014.** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in northern Europe with particular reference to Southern Sweden. *Parasites and Vectors*. 2014, Bd. 7, 102.
- Petney, T., et al. 2015.** Untersuchung der Ökologie von Zecken als Überträger von Krankheitserregern in Baden-Württemberg in Bezug auf Habitat, Landnutzung, Wirtstiere und Klima. *Programm „Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung“ (BWPLUS) Abschlussbericht*. 2015.
- Pfäffle, M., et al. 2014.** Tagungsbeitrag, Workshop on Ticks and tick-borne diseases. *ZUP – Zecken, Umwelt, Pathogene Baden-Württemberg. An interdisciplinary project to study the ecology of ticks as vectors of pathogens in Baden-Württemberg Germany*. Berlin : s.n., 2014.
- Pogodina, V. 1960.** Experimental study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis on alimentary infection. II. Study of pathways of excretion of virus from white mice. *Problems in Virology*. 1960, 5.
- Popov, V. F. 1967.** Infection of the population by goat milk in a focus of tick-borne encephalitis. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*. 1967, Bd. 36, 3.
- Pretzmann, G., Loew, J. und Radda, A. 1963.** Untersuchungen in einem Naturherd der Frühsommer-Meningoenzephalitis in Niederösterreich (3. Mitteilung). *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1963, 190.
- Randolph, S. E. 2002.** Predicting the risk of tick-borne disease. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002, 291 supp. 33.
- **2011.** Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2011, Bd. 2.

- Randolph, S. E., et al. 1998.** Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. *Parasitology*. 1998, Bd. 118, 2.
- Randolph, S. E., Gern, L. und Nuttall, P. A. 1996.** Co-feeding Ticks: Epidemiological Significance for Tick-borne Pathogen Transmission. *Parasitology Today*,. 1996, Bd. 12, 12.
- Rieger, M. A., et al. 1999.** Foxes as Indicators for TBE Endemicity - a Comparative Serological Investigation. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 1999, 289.
- Rielle, N., et al. 2014.** Prevalence and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) in southern Switzerland. *Parasites & Vectors*. 2014.
- RKI. 2017.** survstat 2.0. [Online] Robert-Koch Institut, 2017. [Zitat vom: 15. 03 2017.] <https://survstat.rki.de>.
- Robiller, F. C. 2011.** wikipedia. *wikipedia*. [Online] 01. 03 2011. [Zitat vom: 31. 03 2017.] <https://de.wikipedia.org/wiki/Gelbhalsmaus#/media/File:GelbhalsmausSprung.jpg>.
- Romanova, L. I., et al. 2007.** Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007, 362.
- Saier, R., et al. 2015.** Thermal inactivation of tickborne encephalitis virus in milk. *International Journal of Dairy Technology*. 68, 2015, 3.
- Satz, N. 2006.** *Frühsommer-Meningoenzephalitis*. s.l. : Hubert, 2006.
- Sauvage, F., et al. 2002.** Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes Region, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, Bd. 8, 12.
- Schmaljohn, Connie und Hjelle, Brian. 1997.** Hantaviruses: A Global Disease Problem. *Emerging Infectious Disease*. 1997, Bd. 2, 3.
- Schwaiger, Michaela und Cassinotti, Pascal. 2003.** Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*. 2003, S. 136-145.
- Sonenshine, Daniel E. und Roe, R. Michael. 2014.** *Biology of ticks Band 1*. s.l. : Oxford University Press, 2014.
- . 2014. *Biology of ticks Band 2*. s.l. : Oxford University Press, 2014.
- Stiasny, K. und Heinz, F. X. 2006.** Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*. 2006, 87.
- Suarez, V. B. und Reinheimer, J. A. 2002.** Effectiveness of thermal treatments and biocides in the inactivation of Arentinian *Lactococcus lactis* phages. *Journal of Food Protection*. 2002, 65.
- Süß, J. 2011.** Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia—An overview. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2011, Bd. 2, 15.
- Süß, J., et al. 1992.** Epidemiology and ecology of tick-borne encephalitis in the Eastern part of Germany between 1960 and 1990 and studies on the dynamics of a natural focus of tick-borne encephalitis. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 277, 1992, 2.
- Süß, J., et al. 2004.** Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany – Epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *International Journal of Medical Microbiology*. 2004, 293 supp. 37.

- Takeda, T., et al. 1999.** ISOLATION OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS FROM WILD RODENTS AND A SEROEPIDEMIOLOGIC SURVEY IN HOKKAIDO, JAPAN. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999, Bd. 60, 2.
- Taviner, Mark, Thwaites, Guy und Gant, Vanya. 1998.** The English Sweating Sickness, 1485-1551: A Viral Pulmonary Disease? *Medical History*. 1998.
- Tierley, Grimm, pers. Kommunikation, Martin, Ursula. 2016.** Stuttgart Botnang : s.n., 2016.
- Turni, H. 2005 a.** Gelbhalsmaus *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834). [Buchverf.] Monika Braun/Fritz Dieterlen (Hrsg.). *Die Säugetiere Baden-Württembergs*. s.l. : Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005 a.
- **2005 b.** Waldmaus *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). [Buchverf.] M. Braun und F. Dieterlen. *Die Säugetiere Baden-Württembergs Band 2*. s.l. : Eugen Ulmer GmbH & Co, 2005 b.
- Ulrich, R. G., et al. 2008.** Network “Rodent-borne pathogens” in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. *Parasitology Research*. 2008, 103.
- Utzátegui, N. Y., et al. 2012.** Rate of evolution and molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in Europe, including two isolations from the same focus 44 years apart. *Journal of General Virology*. 2012, Bd. 93.
- Vaheri, Antti, et al. 2013.** Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature reviews Microbiology*. August 2013.
- van der Berg, F. 2016.** *Angewandte Physiologie Band 1*. s.l. : Thieme Verlag, 2016.
- Vapalahti, Olli, et al. 2003.** Hantavirus infections in Europe. *THE LANCET Infectious Diseases*. 2003.
- Waldenström, J., et al. 2007.** Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, Bd. 13, 8.
- Wallner, G., et al. 1996.** Characterization and complete genome sequences of high- and low virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *Journal of General Virology*. 1996, Bd. 77.
- Weidmann, M., et al. 2013.** Molecular phylogeography of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *Journal of General Virology*. 2013, 94.
- Weidmann, M., et al. 2011.** Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *Journal of General Virology*. 2011, Bd. 92.
- Wessel, M. 2010.** Vergleichende epidemiologische Untersuchungen zur FSME. *Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*. Hohenheim : s.n., 2010.
- Wetteronline.de. 2017.** wetteronline. [Online] 03. 12 2017. [Zitat vom: 03. 12 2017.] https://www.wetteronline.de/rueckblick?pcid=pc_rueckblick_data&gid=10738&pid=p_rueckblick_digram&sid=StationHistory&iid=10739&month=03&year=2016&period=16&metparaid=TXLD.
- Wilson, D. E. und Reeder, D. M. 2005.** Mammal Species of the World, 3rd edition. *John's Hopkins University Press*. 3, 2005, Bd. 2, 142pp.
- Zanotto, P. M. de A., et al. 1995.** An Arbovirus Cline across the Northern Hemisphere. *Virology*. 1995.
- Zecken.de.** Zecken.de das Infoportal. *Zecken.de das Infoportal*. [Online] Pfitzer Pharma GmbH.[Zitat vom: 31. 03 2017.] <http://www.zecken.de>.

Abbildungsverzeichnis:

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der phylogenetischen Einordnung von Zecken. Es sind nur nachgewiesene Arten aufgeführt. Verändert nach Oliver, 1989 mit Daten von Guglielone, et al., 2010. | 2 |
| Abbildung 2: Darstellung von Larve, Nymphe und adulten Exemplaren (Männchen unten, Weibchen oben) von <i>I. ricinus</i> . | 4 |
| Abbildung 3: Entwicklungszyklus von <i>I. ricinus</i> . Quelle: (Zecken.de) Abfragedatum: 31.03.2017 | 5 |
| Abbildung 4: Systematische Einordnung der in dieser Arbeit untersuchten Nagetiere (Dieterlen, 2005 (a)) | 7 |
| Abbildung 5: <i>Apodemus spp.</i> im Sprung. Quelle: (Robiller, 2011) Abfrage: 31.03.2017. Anmerkung: Vom Urheber als Gelbhalsmaus bezeichnet. Autor: F.C. Robiller | 8 |
| Abbildung 6: Wanderratte an einem Flusslauf. Deutlich zu erkennen sind die Augen und Ohren die beide kleiner sind als bei der Hausratte. Quelle: (Hellwig, 2009) Datum des Abrufs: 31.03.2017. Autor: Hans-Jörg Hellwig | 9 |
| Abbildung 7: Systematische Positionierung des FSME-Virus innerhalb der Arboviren | 11 |
| Abbildung 8: Schematischer Aufbau des FSME-Genoms: C: Kapsidprotein, preM: Vorläufer Membranprotein, E: Hüllprotein, NS: Nicht-Strukturprotein, Cap: Cap-Struktur, UTR: nicht kodierender Bereich (Verändert nach Leysen, et al., 2000) | 12 |
| Abbildung 9: Schematischer Ablauf der Replikation der FSME-Viren. ER: endoplasmatisches Retikulum, TGN Trans-Golgi-Netzwerk (Stiasny, et al., 2006) | 13 |
| Abbildung 10: Verbreitungsgebiete der Vektorzecken. Blau: <i>I. ricinus</i> , Lila: <i>I. persulcatus</i> , Grün: Beide Arten parallel. Gestrichelte Linie: Verbreitungsgebiet der FSME (Lindquist, et al., 2008) | 14 |
| Abbildung 11: Anzahl gemeldeter Fälle von FSME nach Bundesland und Jahr (Quelle: RKI, 2017) | 15 |
| Abbildung 12: Systematische Positionierung der Hantaviren innerhalb der Familie der Bunyaviridae. | 16 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Hantaviruspartikels. Dargestellt ist die segmentierte RNA, sowie das Nukleokapsid, die RNA-abhängige RNA-Polymerase und die Glykoproteinhülle. Nach Vaheri, et al., 2013 | 17 |
| Abbildung 14: Schematische Darstellung der Vorgänge vor, während und nach der Vermehrung von Hantaviren in Wirtszellen. Nach Vaheri et al., 2013. | 17 |
| Abbildung 15: Anzahl gemeldeter Hantavirusinfektionen nach Bundesland und Jahr. Quelle: Robert Koch-Institut: SurvStat@RKI 2.0, https://survstat.rki.de , Abfragedatum: 14.03.2017 | 21 |
| Abbildung 16: Aufbau einer Zeckenfahne. Eine Zeckenfahne besteht aus einem Rundholz (Griff), einem 1m langen Kantholz (Verbindung) und einem 1m x 1m großen Moltontuch (Fahne). | 23 |
| Abbildung 17: Standort Emmendingen mit geflaggter Strecke. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017 | 24 |
| Abbildung 18: Aufteilung des Flagggebiets Emmendingen 2014 (A+B+C+D) und 2015 (B+C). Quelle: (Google), Abfrage: 31.03.2017 | 24 |
| Abbildung 19: Aufteilung des Fanggebiets Emmendingen 2016. Quelle (Google), Abfrage 31.03.2017 | 25 |
| Abbildung 20: Geflaggte Strecke am Standort Lauterbach. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017 aus (Lindau, 2013) | 25 |
| Abbildung 21: Geflaggte Bereiche am Standort Lorettohof. Quelle: (Google) Abfrage:31.03.2017 | 25 |
| Abbildung 22: Standort Stuttgart Botnang. Markiert in Schwarz: Grenzen des Gartens. Rot: Bereiche in denen Nagetiere gefangen wurden. Quelle (Google), Abfrage: 31.03.2017 | 26 |
| Abbildung 23: Schematischer Ablauf einer Gelelektrophorese. T bezeichnet hier die Taschen. "+" und "-" bezeichnen die jeweiligen Pole der angelegten Gleichspannung. Quelle: verändert nach: http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| Abbildung 24: Schematische Darstellung der Proben und Verdünnungsstufen auf der Platte. Konzentration von oben nach unten abnehmend. | 41 |
| Abbildung 25: Zeigt die Unterteilung des Standorts Emmendingen Neumattengraben in Teilbereiche A, B, C und D | 51 |
| Abbildung 26: Zeigt den Standorte Emmendingen Neumattengraben mit der Unterteilung des Grenzgebiets der Teilbereiche B und C in a, b und c. | 51 |
| Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Gelelektrophorese nach erfolgreiche Amplifikation des E-Gens zweier Virusstämme. n.K.: negative Kontrolle, p.K. positive Kontrolle | 54 |

| | |
|--|-----------|
| Abbildung 28: Zusammensetzung der Sequenz des E-Gens aus drei Teilsequenzen | 55 |
| Abbildung 29: Maximum Parsimony Stammbaum auf Basis der Nukleotidsequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof. | 60 |
| Abbildung 30: Maximum Parsimony Stammbaum auf Basis der Aminosäuresequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof | 61 |
| Abbildung 31: Maximum Likelihood Stammbaum auf Basis der Nukleotidsequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof | 62 |
| Abbildung 32: Maximum Likelihood Stammbaum auf Basis der Aminosäuresequenz. Rot: Botnang, Blau: Emmendingen, Grün: Lorettohof | 63 |
| Abbildung 33: Exemplarische Darstellung des Neutralisationstests. | 66 |
| Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung einiger PCR Amplifikate des Hantaviren Nachweises. | 67 |
| Abbildung 35: Lage der einzelnen Untersuchungsgebiete im Jahr 2015. Bereiche A und D wurden nicht untersucht. In gelb markierte Bereiche waren in den Monaten März und April wegen Waldarbeiten nicht zugänglich. | 71 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Übersicht über einige von <i>I. ricinus</i> übertragene Krankheitserreger (verändert nach Lucius, et al., 2008) | 6 |
| Tabelle 2: Verbreitung, Reservoirwirte und hervorgerufene Erkrankung verschiedener Hantavirusarten. Verändert nach (Krüger, et al., 2013) ergänzt mit Daten von (Klempa, et al., 2012) und (Schmaljohn, et al., 1997). HFRS: Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom, NE: Nephropathia epidemica, HCPS: Hantavirus-assoziiertes kardiopulmonales Syndrom, n.b.: nicht bestimmt | 20 |
| Tabelle 3: GPS-Koordinaten der untersuchten Standorte. *: Zeckenfang, +: Nagerfang, \$: Milchprodukte, ¹ persönliche Mitteilung: Oehme | 23 |
| Tabelle 4: Gefangene Nagetierarten am Standort Botnang in den Jahren 2015 und 2016 | 26 |
| Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Serumproben insbesondere der Impfstatus gegen FSME | 27 |
| Tabelle 6: Poolschema der verschiedenen Zeckenstadien für die Nukleinsäureaufreinigung | 29 |
| Tabelle 7: Sequenz der Primer und Sonde der FSME-V-PCR | 33 |
| Tabelle 8: Pipettierschema pro Probe FSME-V PCR | 34 |
| Tabelle 9: Temperaturprofil der RT-qrt-PCR für FSME-Viren. | 34 |
| Tabelle 10: Sequenz der Primer der E-Gen PCR | 35 |
| Tabelle 11: Pipettierschema pro Probe E-Gen PCR | 35 |
| Tabelle 12: Temperaturprofil der E-Gen PCR. RT.: Reverse Transkription, Denat.: Denaturierung | 35 |
| Tabelle 13: Verwendete Primer der 1. und 2. PCR zum Nachweis von Puumala-Viren | 36 |
| Tabelle 14: Pipettierschema pro Probe; 1.Hanta-PCR | 36 |
| Tabelle 15: Pipettierschema pro Probe; 2.Hanta-PCR | 36 |
| Tabelle 16: Temperaturprofil der 1. Hanta-PCR. RT.: Reverse Transkription, Denat.: Denaturierung, Anneal.: Annealing, Elong.: Elongation | 37 |
| Tabelle 17: Temperaturprofil der 2. Hanta-PCR. Denat.: Denaturierung, Anneal.: Annealing, Elong.: Elongation | 37 |
| Tabelle 18: Verwendete Zelllinien, Zelltyp und Herkunftsspezies, sowie Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zelllinien. | 37 |
| Tabelle 19: Zusammenhang Größe der Zellkulturflaschen und verwendete Menge an PBS zum Waschen bzw. verwendete Menge Trypsin in EDTA zum Ablösen der Zellen. | 38 |
| Tabelle 20: Verwendete Menge an Ausgangsmaterial zur Virusanzucht nach Material und Verwendungszweck | 39 |
| Tabelle 21: Darstellung der CPE Stufen und deren Bedeutung | 39 |
| Tabelle 22: Verwendete Virusstämme und deren Herkunft | 40 |
| Tabelle 23: Schema zur Herstellung der Verdünnungsstufen | 40 |
| Tabelle 24: Versandschema pro Probe. Es wurden pro Probe drei 1,5ml Eppendorfgefäße versand. | 43 |
| Tabelle 25: Anzahl geflaggter Zecken der untersuchten Standorte in den Jahren 2014-2016. Daten für SB aus 2015 stammen aus (Drehmann, 2016) Zahlen in Klammern stellen den im Jahr 2016 Anteil der Zecken des Standortes Lorettohof dar, die aus dem Bereich mit nachgewiesenen FSME-Viren stammen. Abkürzungen: N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang | 48 |
| Tabelle 26: Anzahl geflaggter Zecken der verschiedenen Teile des Standortes Emmendingen Neumattengraben der Jahre 2014-2016. Zahlen in Klammern stellen den im Jahr 2016 molekularbiologisch auf FSME-Viren untersuchten Anteil der Zecken des Standortes Emmendingen Neumattengraben dar. | 48 |
| Tabelle 27: Ergebnisse der Artbestimmung geflaggter Zecken an den Untersuchungsstandorten des Jahres 2014 nach Stadium getrennt. Abkürzungen: L: Larve, N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, EN: Emmendingen Neumattengraben, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang. I.a.: <i>Ixodes acuminatus</i> , I.r.: <i>Ixodes ricinus</i> , I.h.: <i>Ixodes hexagonus</i> , I.f.: <i>Ixodes frontalis</i> , D.r.: <i>Dermacentor reticulatus</i> | 49 |
| Tabelle 28: Ergebnisse der Artbestimmung geflaggter Zecken an den Untersuchungsstandorten der Jahre 2015 und 2016 nach Stadium getrennt. Die Daten des Jahres 2015 des Standortes SB stammen aus (Drehmann, 2016). Abkürzungen: L: Larve, N: Nymphe, M: Männchen, W: Weibchen, EN: Emmendingen | |

| | |
|--|----|
| Neumattengraben, La: Lauterbach, Lh: Lorettohof, SB: Stuttgart Botnang. I.a.: <i>Ixodes acuminatus</i> , I.r.: <i>Ixodes ricinus</i> , I.h.: <i>Ixodes hexagonus</i> , I.f.: <i>Ixodes frontalis</i> , D.r.: <i>Dermacentor reticulatus</i> | 49 |
| Tabelle 29: Anzahl und Art gefangener Nagetiere am Standort Stuttgart Botnang der Jahre 2015 und 2016. | 50 |
| Tabelle 30: Zeigt die positiv auf FSME-Viren getesteten Zeckenproben nach Standort Jahr und Zeckenstadium getrennt. | 50 |
| Tabelle 31: Anzahl untersuchter Organproben nach Jahr Nagetierart und Verfügbarkeit. *: Eine Probe des Gehirns konnte nicht genommen werden. | 52 |
| Tabelle 32: Anzahl untersuchter Proben nach Produktart sowie Anzahl positiv getesteter Proben ¹ : davon einer mit Curry, ² : ohne Curryzusatz | 52 |
| Tabelle 33: Auswahl der untersuchten Milchprodukte. Dargestellt sind die Proben, die mittels PCR positiv auf FSME-Viren getestet wurden, sowie die Anzahl positiver Einzeluntersuchungen. | 52 |
| Tabelle 34: Übersicht aller FSME-positiven Proben, deren Anzuchtergebnis, sowie der Änderung des Ct-Werts in der qrt-PCR. | 54 |
| Tabelle 35: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate vom Standort Emmendingen. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Nukleotidaustauschen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 1488bp lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Nukleotiden, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. nt: Nukleotide (Material für Stämme N857 und N858: (Lindau, 2013)) | 55 |
| Tabelle 36: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate vom Standort Emmendingen. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Aminosäureänderungen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 496 Aminosäuren lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Aminosäuren, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. aa: Aminosäuren (Material für Stämme N857 und 858: (Lindau, 2013)) | 56 |
| Tabelle 37: Zeigt die Unterschiede zwischen dem ersten in Emmendingen isolierten Stamm N857 und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank). nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren | 56 |
| Tabelle 38: Zeigt die Unterschiede zwischen den in Botnang isolierten Stämmen und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank). nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren | 56 |
| Tabelle 39: Zeigt die Unterschiede zwischen dem Isolat aus Ziegenkäse, sowie der Zecke vom Standort Lorettohof und den Stämmen mit der größten Übereinstimmung in der Gendatenbank (Genbank) . nt: Nukleotide, aa: Aminosäuren | 57 |
| Tabelle 40: Darstellung der Unterschiede der verschiedenen Isolate aller untersuchten Standorte. Unteres Dreieck: Prozentualer Anteil von Nukleotidaustauschen auf die Gesamtsequenz bezogen. Diese war bei den Untersuchungen 1488bp lang. Es wurde auf die vierte Nachkommastelle gerundet. Oberes Dreieck: Anzahl an Nukleotiden, in denen sich die entsprechenden Sequenzen unterscheiden. nt: Nukleotide (Material für Stämme N857 und N858: (Lindau, 2013)) | 58 |
| Tabelle 41: Zeigt die zusätzlich verwendeten Virusstämme zur Stammbaumerstellung. Daten der Außengruppe um den Stammbaum wurzeln zu können. * Daten erhalten von PD Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München | 59 |
| Tabelle 42: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von PS-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen. | 64 |
| Tabelle 43: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von A549-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen | 64 |
| Tabelle 44: Zeitlicher Verlauf des CPE der Infektion von Vero B4-Zellen mit 5 verschiedenen FSME-Stämmen. | 65 |
| Tabelle 45: Ergebnisse des Neutralisationstests. | 65 |
| Tabelle 46: Übersicht über die positiv auf Hantaviren des Typs Puumala getesteten Lungengewebsproben der Jahre 2015 und 2016 von dem Standort Stuttgart Botnang. | 66 |

Probenübersicht

Zecken

| Botnang | | | | | | |
|----------------|-------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Monat | Jahr | Stadium | Geschlecht | Anzahl I.r. | FSME positiv | Anmerkung |
| März | 2015 | N | n.d. | 60 | 0 | |
| April | 2015 | N | n.d. | 126 | 0 | |
| Mai | 2015 | N | n.d. | 187 | 0 | |
| Juni | 2015 | N | n.d. | - | 0 | |
| Juli | 2015 | N | n.d. | 0 | 0 | |
| August | 2015 | N | n.d. | 0 | 0 | |
| September | 2015 | N | n.d. | 1 | 0 | |
| Oktober | 2015 | N | n.d. | 63 | 0 | |
| März | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| April | 2015 | A | M | 4 | 0 | |
| Mai | 2015 | A | M | 7 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | M | - | 0 | |
| Juli | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| August | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| September | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| März | 2015 | A | W | 0 | 0 | |
| April | 2015 | A | W | 3 | 0 | |
| Mai | 2015 | A | W | 4 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | W | - | 0 | |
| Juli | 2015 | A | W | 0 | 0 | |
| August | 2015 | A | W | 0 | 0 | |
| September | 2015 | A | W | 0 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | W | 0 | 0 | |
| | | | | | | |
| April | 2016 | N | n.d. | 175 | 0 | |
| Mai | 2016 | N | n.d. | 107 | 0 | |
| Juni | 2016 | N | n.d. | 404 | 1 | |
| Juli | 2016 | N | n.d. | 273 | 1 | |
| August | 2016 | N | n.d. | 138 | 0 | |
| September | 2016 | N | n.d. | 236 | 0 | |
| April | 2016 | A | M | 46 | 0 | |
| Mai | 2016 | A | M | 106 | 0 | |
| Juni | 2016 | A | M | 94 | 0 | |
| Juli | 2016 | A | M | 40 | 0 | |
| August | 2016 | A | M | 127 | 0 | |
| September | 2016 | A | M | 54 | 0 | |
| April | 2016 | A | W | 33 | 0 | |

| | | | | | | |
|-----------|------|---|---|-----|---|--|
| Mai | 2016 | A | W | 258 | 0 | |
| Juni | 2016 | A | W | 27 | 0 | |
| Juli | 2016 | A | W | 64 | 0 | |
| August | 2016 | A | W | 13 | 0 | |
| September | 2016 | A | W | 3 | 0 | |

Inhaltsverzeichnis

| Emmendingen | | | | | | |
|-------------|------|---------|------------|-------------|--------------|-----------|
| Monat | Jahr | Stadium | Geschlecht | Anzahl I.r. | FSME positiv | Anmerkung |
| März | 2014 | N | n.d. | 15 | 0 | |
| April | 2014 | N | n.d. | 165 | 0 | |
| Mai | 2014 | N | n.d. | 204 | 0 | |
| Juni | 2014 | N | n.d. | 487 | 0 | |
| Juli | 2014 | N | n.d. | 177 | 0 | |
| August | 2014 | N | n.d. | 62 | 1 | |
| September | 2014 | N | n.d. | 101 | 0 | |
| Oktober | 2014 | N | n.d. | 23 | 0 | |
| März | 2014 | A | M | 0 | 0 | |
| April | 2014 | A | M | 45 | 0 | |
| Mai | 2014 | A | M | 37 | 0 | |
| Juni | 2014 | A | M | 38 | 0 | |
| Juli | 2014 | A | M | 58 | 0 | |
| August | 2014 | A | M | 22 | 0 | |
| September | 2014 | A | M | 8 | 0 | |
| Oktober | 2014 | A | M | 0 | 0 | |
| März | 2014 | A | W | 12 | 0 | |
| April | 2014 | A | W | 43 | 1 | |
| Mai | 2014 | A | W | 71 | 0 | |
| Juni | 2014 | A | W | 60 | 0 | |
| Juli | 2014 | A | W | 51 | 0 | |
| August | 2014 | A | W | 37 | 0 | |
| September | 2014 | A | W | 1 | 0 | |
| Oktober | 2014 | A | W | 0 | 0 | |
| | | | | | | |
| März | 2015 | N | n.d. | 48 | 0 | |
| April | 2015 | N | n.d. | 143 | 0 | |
| Mai | 2015 | N | n.d. | 555 | 1 | 2x I.h. |
| Juni | 2015 | N | n.d. | 794 | 0 | |
| Juli | 2015 | N | n.d. | 712 | 0 | |
| August | 2015 | N | n.d. | 214 | 0 | 1x I.a. |
| September | 2015 | N | n.d. | 147 | 0 | |
| Oktober | 2015 | N | n.d. | 47 | 0 | |
| März | 2015 | A | M | 8 | 0 | |
| April | 2015 | A | M | 11 | 0 | 3x D.r. |
| Mai | 2015 | A | M | 72 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | M | 94 | 0 | |
| Juli | 2015 | A | M | 184 | 0 | |
| August | 2015 | A | M | 34 | 0 | |
| September | 2015 | A | M | 84 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | M | 72 | 0 | |
| März | 2015 | A | W | 41 | 0 | |
| April | 2015 | A | W | 33 | 0 | 2x D.r. |

| | | | | | | |
|-----------|------|---|------|-----|---|---------|
| Mai | 2015 | A | W | 129 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | W | 261 | 0 | |
| Juli | 2015 | A | W | 152 | 1 | |
| August | 2015 | A | W | 69 | 0 | |
| September | 2015 | A | W | 65 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | W | 14 | 0 | |
| | | | | | | |
| März | 2016 | N | n.d. | 83 | 0 | 1x l.a. |
| April | 2016 | N | n.d. | 272 | 0 | 2x l.h. |
| Mai | 2016 | N | n.d. | 905 | 0 | |
| Juni | 2016 | N | n.d. | 897 | 1 | 2x l.a. |
| Juli | 2016 | N | n.d. | 401 | 0 | |
| August | 2016 | N | n.d. | 52 | 0 | |
| September | 2016 | N | n.d. | 221 | 0 | |
| Oktober | 2016 | N | n.d. | 34 | 0 | 1x l.a. |
| März | 2016 | A | M | 15 | 0 | |
| April | 2016 | A | M | 18 | 0 | |
| Mai | 2016 | A | M | 169 | 0 | |
| Juni | 2016 | A | M | 153 | 0 | |
| Juli | 2016 | A | M | 178 | 0 | |
| August | 2016 | A | M | 23 | 0 | |
| September | 2016 | A | M | 7 | 1 | 1x l.a. |
| Oktober | 2016 | A | M | 31 | 0 | |
| März | 2016 | A | W | 4 | 0 | |
| April | 2016 | A | W | 29 | 0 | |
| Mai | 2016 | A | W | 168 | 0 | |
| Juni | 2016 | A | W | 169 | 1 | |
| Juli | 2016 | A | W | 172 | 0 | |
| August | 2016 | A | W | 28 | 0 | |
| September | 2016 | A | W | 11 | 0 | |
| Oktober | 2016 | A | W | 1 | 0 | |

Inhaltsverzeichnis

| Lauterbach | | | | | | |
|-------------------|-------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Monat | Jahr | Stadium | Geschlecht | Anzahl I.r. | FSME positiv | Anmerkung |
| März | 2014 | N | n.d. | 24 | 0 | |
| April | 2014 | N | n.d. | 121 | 0 | |
| Mai | 2014 | N | n.d. | 155 | 0 | |
| Juni | 2014 | N | n.d. | 161 | 0 | 3x I.a. |
| Juli | 2014 | N | n.d. | 168 | 0 | 1x I.a. |
| August | 2014 | N | n.d. | 116 | 0 | |
| September | 2014 | N | n.d. | 0 | 0 | |
| Oktober | 2014 | N | n.d. | 0 | 0 | |
| März | 2014 | A | M | 4 | 0 | |
| April | 2014 | A | M | 11 | 0 | |
| Mai | 2014 | A | M | 23 | 0 | |
| Juni | 2014 | A | M | 56 | 0 | |
| Juli | 2014 | A | M | 39 | 0 | |
| August | 2014 | A | M | 7 | 0 | |
| September | 2014 | A | M | 0 | 0 | |
| Oktober | 2014 | A | M | 0 | 0 | |
| März | 2014 | A | W | 1 | 0 | |
| April | 2014 | A | W | 41 | 0 | |
| Mai | 2014 | A | W | 72 | 0 | |
| Juni | 2014 | A | W | 34 | 0 | |
| Juli | 2014 | A | W | 65 | 0 | |
| August | 2014 | A | W | 52 | 0 | |
| September | 2014 | A | W | 0 | 0 | |
| Oktober | 2014 | A | W | 0 | 0 | |
| | | | | | 0 | |
| März | 2015 | N | n.d. | 41 | 0 | |
| April | 2015 | N | n.d. | 57 | 0 | 2x I.a. |
| Mai | 2015 | N | n.d. | 90 | 0 | |
| Juni | 2015 | N | n.d. | 102 | 0 | 5x I.a. |
| Juli | 2015 | N | n.d. | 193 | 0 | 1x I.a. |
| August | 2015 | N | n.d. | 96 | 0 | |
| September | 2015 | N | n.d. | 270 | 0 | |
| Oktober | 2015 | N | n.d. | 0 | 0 | |
| März | 2015 | A | M | 21 | 0 | |
| April | 2015 | A | M | 26 | 0 | |
| Mai | 2015 | A | M | 42 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | M | 86 | 0 | |
| Juli | 2015 | A | M | 28 | 0 | |
| August | 2015 | A | M | 1 | 0 | |
| September | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | M | 0 | 0 | |
| März | 2015 | A | W | 19 | 0 | |
| April | 2015 | A | W | 6 | 0 | |

| | | | | | | |
|-----------|------|---|---|----|---|--|
| Mai | 2015 | A | W | 70 | 0 | |
| Juni | 2015 | A | W | 76 | 0 | |
| Juli | 2015 | A | W | 54 | 0 | |
| August | 2015 | A | W | 68 | 0 | |
| September | 2015 | A | W | 58 | 0 | |
| Oktober | 2015 | A | W | 0 | 0 | |

| Loretthof | | | | | | |
|------------------|-------------|----------------|-------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| Monat | Jahr | Stadium | Geschlecht | Anzahl I.r. | FSME positiv | Anmerkung |
| August | 2016 | n.d. | N | 118(81) | 0 | |
| September | 2016 | n.d. | N | 119(119) | 0 | |
| August | 2016 | A | M | 53(13) | 0 | |
| September | 2016 | A | M | 46(46) | 0 | |
| August | 2016 | A | W | 61(39) | 0 | |
| September | 2016 | A | W | 20(20) | 1 | |

Nagetiere

| Botnang | | | | |
|----------------|----------------|--|--|------------------|
| Jahr | Quartal | <i>M. glareolus</i> (davon Hanta positiv) | <i>A. flavicollis</i> (davon Hanta positiv) | Bemerkung |
| 2015 | 1 | 14 (10) | 4 (0) | - |
| 2015 | 2 | 21 (21) | 2 (0) | 2x A.s. |
| 2015 | 3 | 16 (16) | 0 (0) | 1x R.r. |
| 2015 | 4 | 29 (28) | 5 (0) | 1x A.s. |
| | | | | |
| 2016 | 1 | 8 (4) | 1 | - |
| 2016 | 2 | 4(1) | 4 | - |
| 2016 | 3 | 2 (0) | 1 | - |
| 2016 | 4 | 11 (6) | 1 | - |

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Ute Mackenstedt, Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim, danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Begutachtung der Arbeit und ihre stete Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Johannes Steidle, Fachgebiet Tierökologie der Universität Hohenheim, danke ich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig, Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim, gilt mein Dank für die Übernahme der Aufgabe des Drittprüfers.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Rainer Oehme, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, für die geduldige Hilfe, die vielen Vor- und Ratschläge, die Möglichkeit einen großen Teil meiner Laborarbeit dort durchführen zu können sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit seit meiner Masterarbeit.

Herrn PD Dr. Gerhard Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, danke ich für die Möglichkeit bei ihm den Neutralisationstest durchführen zu können, sowie die vielen, sehr interessanten Gespräche.

Frau Dr. Daniela Kömpf danke ich für die viele Zeit, die sie an meiner Seite im S3-Labor verbracht hat, um mir so das Arbeiten zu ermöglichen.

Herrn Marco Drehmann danke ich herzlich für die tolle und freundschaftliche Zusammenarbeit, die konstruktive Kritik sowie die fortwährende Unterstützung und Ausdauer beim Korrekturlesen. Vielen Dank!

Herrn Tierley und Frau Grimm danke ich für die Möglichkeit ihren Garten beproben zu dürfen.

Ebenfalls bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen der Molekularbiologie und des S3-Teams des Landesgesundheitsamts Stuttgart für die stets gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Ratschläge für den Laboralltag.

Außerdem Dank an alle Mitarbeiter/innen des Fachgebiets Parasitologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die zahllosen interessanten Fachgespräche und die nette Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für die andauernde Unterstützung und Bestärkung sowie die schönen Ablenkungen.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich darüber hinaus stets unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

| | |
|---------------------|------------------------------|
| Vor- und Zuname | Alexander Lindau |
| Geburtsdatum / -ort | 11.12.1986 / Herrenberg |
| Adresse | Kniebisweg 6, 71139 Ehningen |

Studium

| | |
|-------------------|---|
| Seit 03/2014 | Dissertation mit Abschluss Dr. rer. nat. an der Universität Hohenheim, Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie in Kooperation mit dem Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg (Referat 93) im Regierungspräsidium Stuttgart. (Thema der Arbeit: Untersuchungen viraler, zoonotischer Erreger in Baden-Württemberg) |
| 10/2011 - 03/2014 | Biologiestudium mit Abschluss Master of Science an der Universität Hohenheim, Schwerpunkt: Parasit-Wirt-Interaktion, Note: 1,2. (Masterarbeit am Institut für Zoologie, Fachgebiet Parasitologie, Thema: Epidemiologische Untersuchungen an <i>Ixodes ricinus</i> in Baden-Württemberg, Note: 1,0) |
| 04/2008 - 09/2011 | Biologiestudium mit Abschluss Bachelor of Science an der Universität Hohenheim, Schwerpunkt: Zoologie, Wahlmodule: Infektion und Immunität, Mikrobiologische Diagnostik in der Humanmedizin, Note: 2,2. (Bachelorarbeit: Molekularbiologischer Nachweis von Leishmanien in Wildtieren aus Baden-Württemberg, Note: 1,0) |
| 10/2007 - 04/2008 | Lehramtsstudium für Gymnasien (Fächer: Biologie/Mathematik) an den Universitäten Hohenheim und Stuttgart |

Schulbildung

| | |
|---------|--|
| 08/2006 | Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Otto-Hahn-Gymnasium Böblingen |
|---------|--|

Praktika / Seminare, Sonstiges

- 02/2013 – 04/2013 Praktikum am Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München: Phylogenetische Untersuchungen an FSME-Stämmen aus Baden-Württemberg
- 09/2012 – 01/2013 Praktikum am Landesgesundheitsamt Stuttgart
- Untersuchungen zur Reservoirwirtkompetenz von Schwarzwild und Rehwild in Bezug auf durch Zecken übertragene Erreger
- Epidemiologische Untersuchungen zur FSME in Rumänien: Molekularbiologische Untersuchungen an Zecken, serologische Untersuchungen bei Ziegen
- 07/2012 ELLS Summer University 2012 „Pathogens, Parasites and their Hosts: Ecology, molecular interactions and evolution“, Note: A-

Sprachkenntnisse

Englisch fließend

Tagungsbeiträge

Lindau A, Brockmann SO, Oehme R, Buckenmaier T, Beer M, Jeffery-Smith A, Spannenkrebs M, Haag-Milz S, Wagner-Wiening C, Schlegel C, Fritz J, Zange S, Bestehorn M, Hoffmann D, Tiberi S, Mackenstedt U, Dobler G

First outbreak of tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurized goat cheese in Germany, July 2016

Workshop on Arthropod-Borne Disease, Jena, 16-17 11 2017

Lindau A, Brockmann SO, Oehme R, Buckenmaier T, Beer M, Jeffery-Smith A, Spannenkrebs M, Haag-Milz S, Wagner-Wiening C, Schlegel C, Fritz J, Zange S, Bestehorn M, Hoffmann D, Tiberi S, Mackenstedt U, Dobler G

First outbreak of tick-borne encephalitis transmitted by unpasteurized goat cheese in Germany, July 2016

19th Meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Diseases, Wien, Österreich, 29-30.05.2017

Lindau A, Oehme R, Dobler G, Mackenstedt U

FSME-Standorte Emmendingen, Botnang, Schramberg: Nachweis von FSME-Erregern in Zecken

3. Süddeutscher Zeckenkongress, Stuttgart Hohenheim, 14.-16.03.2016

Lindau A, Kahl O, Dautel H, Pfeffer M, Oehme R, Mackenstedt U

Vergleiche von *Dermacentor reticulatus* und *Ixodes ricinus* Habitaten mit der Ellenberganalyse

3. Süddeutscher Zeckenkongress, Stuttgart Hohenheim, 14.-16.03.2016

Lindau A, Pettney T, Pfäffle M, Littwin N, Norra S, Böhnke D, Hogewind F, Gebhardt R, Oehme R, Sebastian P, Steidle J, Kahl O, Dautel H, Mackenstedt U

Study on the ecology of ticks as vectors of pathogens concerning habitat, land use, hosts and climate in Baden-Wuerttemberg

27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Göttingen, 09.-12.03.2016

Lindau A, Pettney T, Pfäffle M, Littwin N, Norra S, Böhnke D, Hogewind F, Gebhardt R, Oehme R, Sebastian P, Steidle J, Kahl O, Dautel H, Mackenstedt U

Impact of ecology, climate and vegetation on ticks – an interdisciplinary project in

Baden-Wuerttemberg, Germany

18th Meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Diseases, Wien, Österreich, 27.-29.01.2016

Ehningen, 10.12.2018