

Aus der Abteilung Medizinische Mikrobiologie  
(Prof. Dr. med. U. Groß)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Untersuchung zum Vorkommen von Frühsommermeningoenzephalitis-  
Viren, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagozytophilum* in  
Zeckenpopulationen und Untersuchung zur Antikörperprävalenz gegen  
Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in der Bevölkerung der Region  
Wingst/Cuxhaven**

INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg- August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Christiane Timmerberg  
aus  
Münster

Göttingen 2011

**Dekan:**

**Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**1. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. H. Eiffert**

**2. Berichterstatter:**

**PD Dr. med. H. Schmidt**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**14. November 2011**

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Frühsommermeningoenzephalitis</b>	<b>3</b>
1.1.1	Das Krankheitsbild der Frühsommermeningoenzephalitis	3
1.1.2	Diagnostik, Therapie und Prognose der Frühsommermeningoenzephalitis	4
1.1.3	Epidemiologie der Frühsommermeningoenzephalitis	5
1.1.4	Systematik, Morphologie und Genom von Frühsommermeningoenzephalitis- Viren	8
1.2	<b>Der Vektor <i>Ixodes ricinus</i></b>	<b>9</b>
1.3	<b>Weitere durch <i>Ixodes ricinus</i> übertragene Erkrankungen</b>	<b>12</b>
1.3.1	Humane Granulozytäre Anaplasiose	12
1.3.1.1	Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie der humanen granulozytären Anaplasiose	12
1.3.1.2	Epidemiologie der humanen granulozytären Anaplasiose und <i>Anaplasma phagozytophilum</i>	14
1.3.1.3	Systematik und Morphologie	15
1.3.1.4	Wirtsspektrum und Vektoren von <i>Anaplasma phagozytophilum</i>	15
1.3.2	Lyme- Borreliose	15
1.3.2.1	Klinik, Diagnose und Therapie der Lyme- Borreliose	16
1.3.2.2	Epidemiologie der Lyme-Borreliose und <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	17
1.3.2.3	Systematik, Morphologie und Genom von <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	18
1.4	<b>Zielsetzung</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1.1	Reagenzien und Chemikalien	21
2.1.2	Zusammensetzung der Lösungen und Puffer	21
2.1.3	Enzyme	22
2.1.4	Nukleotide und Nukleinsäuren	22
2.1.5	Analyse-Systeme	23
2.1.6	Zellkultur	23
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	23
2.1.8	Geräte und Hilfsmittel	23
2.1.9	Software	24
2.2	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
2.2.1	Sammlung der Zecken in der Region Wingst	24
2.2.2	Extraktion von Nukleinsäure aus Zecken	25
2.2.2.1	RNA- Extraktion	26
2.2.2.2	DNA- Extraktion	27
2.2.3	Polymerase- Kettenreaktion mit Nachweis der Amplifikate	28
2.2.3.1	Amplifikation von DNA mittels nested PCR	28
2.2.3.2	Gelelektrophorese und Detektion der nested PCR-Amplifikate	29
2.2.3.3	Amplifikation von DNA mittels real- time PCR und anschließender Detektion durch Fluoreszenzfarbstoff und Schmelzkurvenanalyse	29
2.2.4	Sequenzanalyse	30
2.2.5	Statistik	31
2.2.6	Methoden zur Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren	31
2.2.6.1	PCR zum Nachweis der Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- RNA	32
2.2.6.2	Detektion amplifizierter Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Nukleinsäure	34

2.2.6.3	Sequenzanalyse möglicher Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Amplifikate	34
2.2.7	Enzymimmunoassay zur Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren	35
2.2.7.1	Enzymimmunoassay	35
2.2.7.2	Patientenfragebogen	36
2.2.8	Methoden zur Untersuchung auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i>	36
2.2.8.1	PCR zum Nachweis von <i>Anaplasma- phagozytophilum</i> - DNA und Detektion mittels Hybridisierungssonden und Schmelzkurvenanalyse	37
2.2.8.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von <i>A. phagozytophilum</i> - PCR- Amplifikaten	38
2.2.8.3	Sequenzanalyse möglicher <i>A. phagozytophilum</i> - Amplifikate	38
2.2.9	Methoden zur Untersuchung auf <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	39
2.2.9.1	PCR zum Nachweis von <i>Borrelia- burgdorferi</i> - sensu- lato- DNA und anschließender Detektion mittels Taq- man- Sonden	39
2.2.9.2	Differenzierung der Genotypen	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren</b>	<b>43</b>
3.1.1	Nachweis von Frühsommermeningoenzephalitis- Viren	43
3.1.2	Sequenzanalyse des Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Amplifikats	45
3.1.3	Statistische Auswertung der Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in Zecken	46
3.1.4	Auswertung der Untersuchung zur Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in der Bevölkerung der Wingst	47
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i></b>	<b>48</b>
3.2.1	Nachweis von <i>Anaplasma phagozytophilum</i>	48
3.2.2	Statistische Auswertung der Untersuchung auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i> in Zecken	50
3.2.3	Sequenzanalyse der PCR- Amplifikate zum Nachweis auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i>	50
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung der Zecken auf <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i></b>	<b>52</b>
3.3.1	Nachweis von <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	52
3.3.2	Statistische Auswertung der Untersuchung auf <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	53
3.3.3	Untersuchung zum Vorkommen der Genospezies von <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	54
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung der Untersuchung auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i> und <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> im Hinblick auf Koinfektionen</b>	<b>55</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung zur Prävalenz von Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- spezifischen Antikörpern in der Bevölkerung der Wingst</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung auf <i>Anaplasma phagozytophilum</i></b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Untersuchung auf <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i></b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Koinfektionen</b>	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>

<b>6</b>	<b><i>Literatur</i></b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b><i>Anhang: Fragebogen zur Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in der Bevölkerung der Wingst</i></b>	<b>93</b>

## Abkürzungen

<i>A. phagozytophilum</i>	<i>Anaplasma phagozytophilum</i>
Aqua ad.	Aqua ad injectabilia
<i>B. afzelii</i>	<i>Borrelia afzelii</i>
<i>B. bissettii</i> sp. nov.	<i>Borrelia bissettii</i> sp. nov.
<i>B. burgdorferi</i> s. l.	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
<i>B. garinii</i>	<i>Borrelia garinii</i>
Borrelien spp.	Borrelienspezies
bp	Basenpaare
<i>B. spielmanii</i>	<i>Borrelia spielmanii</i>
°C	Grad Celsius
cDNA	copyDNA
<i>C. Midichloria m.</i>	<i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i>
cm	Zentimeter
cop/μl	Kopien/μl
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. equi</i>	<i>Ehrlichia equi</i>
EIA, ELISA	Enzymimmunoassay
<i>E. phagozytophila</i>	<i>Ehrlichia phagozytophila</i>
etc.	et cetera
Ethanol abs.	Ethanol absoluta
FSME	Frühsommermeningoenzephalitis
FSMEV	Frühsommermeningoenzephalitis- Viren
HGA	Humane Granulozytäre Anaplasrose
IfSG	Infektionsschutzgesetz
IFT	Immunfluoreszenztest
<i>I. pacificus</i>	<i>Ixodes pacificus</i>
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
<i>I. scapularis</i>	<i>Ixodes scapularis</i>
km <sup>2</sup>	Quadratkilometer
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
NLGA	Niedersächsisches Landesgesundheitsamt Hannover
nm	Nanometer
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
RKI	Robert Koch- Institut
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
STIKO	Ständige Impfkommission
TBE	Tick- borne Encephalitis
V	Volt
VE	Virotech- Einheiten

## Abbildungen

Abbildung 1	Biphasischer Verlauf der FSME, Bildung spezifischer Antikörper und ihr Nachweis im Blut und Liquor.	4
Abbildung 2	Durchschnittliche 1- Jahres- FSME- Inzidenzen zwischen 1964 und 2009.	6
Abbildung 3	Aufbau von FSMEV.	8
Abbildung 4	Die verschiedenen Stadien von <i>I. ricinus</i> im gesogenen und ungesogenen Zustand.	11
Abbildung 5	Nach Wright gefärbte neutrophile Granulozyten mit intrazellulären Morulae und der Lebenszyklus von <i>A. phagozytophilum</i> .	13
Abbildung 6	Vorkommen der Lyme- Borreliose weltweit.	18
Abbildung 7	Darstellung von <i>B. burgdorferi</i> s. l. mittels Immunfluoreszenztest und als Querschnittsskizze.	19
Abbildung 8	Übersicht über die untersuchte Gemeinde Wingst, Aufnahme eines beispielhaften Sammelortes.	25
Abbildung 9	Genaue Kartierung der Gemeinde Wingst, Sammelorte der Jahre 2008 und 2009.	42
Abbildung 10	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR- Amplifikate zum Nachweis von FSMEV.	44
Abbildung 11	Gelelektrophoretische Auftrennung von Verdünnungsreihen hergestellt aus den PCR- Amplifikaten des positiv getesteten Zeckenpools und der mitgeführten positiven Kontrolle zum Nachweis von FSMEV.	45
Abbildung 12	In der Sequenzanalyse untersuchte Nukleotidabfolge der auf FSMEV positiv getesteten Zeckenprobe und der positiven Kontrolle im Vergleich zu der Nukleotidabfolge der bereits bekannten FSMEV- Nukleotidabfolge mit der Genbanknummer DQ153877.1 im Bereich der 7808. bis 8019. beziehungsweise der 7805. bis 8019. Nukleotide der Originalsequenz.	46
Abbildung 13	Nachweis von <i>A. phagozytophilum</i> . Typischer Schmelzkurvenverlauf nach PCR.	49
Abbildung 14	In der Sequenzanalyse ermittelte Nukleotidabfolge eines PCR- Amplifikats zum Nachweis auf <i>A. phagozytophilum</i> mit einem Peak in der Schmelzkurve bei 69 °C im Vergleich zu der bereits bekannten <i>A. phagozytophilum</i> Nukleotidsequenz mit der Genbanknummer HQ630623.1.	51
Abbildung 15	In der Sequenzanalyse ermittelte Nukleotidabfolge eines PCR- Amplifikats zum Nachweis auf <i>A. phagozytophilum</i> mit einem Peak in der Schmelzkurve bei 53 °C im Vergleich zu der bereits bekannten Nukleotidsequenz von <i>C. Midichloria m.</i> mit der Genbanknummer GU734326.1.	52
Abbildung 16	Beispielhafter Light- Cycler- Kurvenverlauf für den Nachweis einer Borrelien- infizierten Zecke.	53

Abbildung 17	Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle der mit <i>B. burgdorferi</i> s. l. infizierten Zecken und ihrer Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechter.	54
Abbildung 18	Verteilung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in der Wingst.	55
Abbildung 19	Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle von koinfizierten <i>I. ricinus</i> , ihren Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechtern mit <i>A. phagozytophilum</i> und <i>B. burgdorferi</i> s. l. im Vergleich zu den Prävalenzen von Einzelinfektionen mit <i>A. phagozytophilum</i> oder <i>B. burgdorferi</i> s. l..	56
Abbildung 20	FSME- Risikogebiete 2004 und 2009 im Vergleich.	61



## Tabellen

Tabelle 1	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer, ihre Basenabfolgen, die Sequenzlänge ihrer Amplifikate und ihre Hersteller.	22
Tabelle 2	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sonden, ihre Basenabfolge und ihre Hersteller.	23
Tabelle 3	Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Nukleotide und ihre Hersteller.	23
Tabelle 4	Reaktionsansatz laut Herstellerangaben mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit zur Synthese von cDNA aus FSMEV- RNA mittels reverser Transkriptase.	32
Tabelle 5	Temperaturprotokoll laut Herstellerangaben mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit zur Synthese von cDNA aus FSMEV- RNA mittels reverser Transkriptase.	32
Tabelle 6	Reaktionsansatz für den ersten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV.	33
Tabelle 7	Primer für den Nachweis von FSMEV, die Zielsequenz liegt innerhalb des NS5- Gens.	33
Tabelle 8	Temperatur- Protokoll für den ersten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV.	33
Tabelle 9	Reaktionsansatz für den zweiten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV- RNA.	34
Tabelle 10	Temperaturprotokoll für den zweiten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV.	34
Tabelle 11	Reaktionsansatz für den Nachweis von <i>A. phagozytophilum</i> durch Amplifikation von 16S rRNA.	37
Tabelle 12	Primer für den Nachweis von <i>A. phagozytophilum</i> - 16S rRNA.	37
Tabelle 13	Temperaturprotokoll für den Nachweis von <i>A. phagozytophilum</i> durch Amplifikation von 16S rRNA.	38
Tabelle 14	Temperaturprotokoll für die Schmelzkurvenanalyse zum spezifizierten Nachweis von <i>A. phagozytophilum</i> durch Amplifikation von 16S rRNA.	38
Tabelle 15	Reaktionsansatz für den Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s. l. durch Amplifikation eines Nukleinsäureabschnittes innerhalb des Flagellin- Gens.	39
Tabelle 16	Temperaturprotokoll für den Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s. l. durch Amplifikation eines Nukleinsäureabschnittes innerhalb des Flagellin- Gens.	39
Tabelle 17	Primer für den Nachweis und die Differenzierung mit <i>B. burgdorferi</i> s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens.	40
Tabelle 18	Reaktionsansatz für den Nachweis und die Differenzierung von <i>B. burgdorferi</i> s. l.- Genospezies mittels real-time PCR auf Grundlage des recA- Gens.	40

Tabelle 19	Temperaturprotokoll für den Nachweis und die Differenzierung von <i>B. burgdorferi</i> s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens.	41
Tabelle 20	Temperaturprotokoll der Schmelzkurvenanalyse für den Nachweis und die Differenzierung von <i>B. burgdorferi</i> s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens.	41
Tabelle 21	Spezifische Schmelztemperaturen zur Differenzierung der einzelnen Genotypen von <i>B. burgdorferi</i> s. l..	41
Tabelle 22	Anzahl der auf eine Durchseuchung mit FSMEV untersuchten Zecken.	43
Tabelle 23	Anzahl der auf <i>A. phagozytophilum</i> untersuchten <i>I. ricinus</i> , unterschieden nach Entwicklungsstadium beziehungsweise Geschlecht.	48
Tabelle 24	Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle von <i>A. phagozytophilum</i> - infizierten Zecken, ihren Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechtern.	50
Tabelle 25	Übersicht über Untersuchungen der Infektionsraten von <i>I. ricinus</i> mit FSMEV in Deutschland.	60
Tabelle 26	Übersicht über Infestationsraten von <i>I. ricinus</i> mit <i>A. phagozytophilum</i> .	68
Tabelle 27	Übersicht über Infektionsraten von <i>I. ricinus</i> mit <i>B. burgdorferi</i> s. l..	71
Tabelle 28	Übersicht über die Prävalenz von koinfizierten Ixodes- Zecken mit <i>A. phagozytophilum</i> und <i>B. burgdorferi</i> s. l..	72

## 1 Einleitung und Zielsetzung

Die Frühsommermeningoenzephalitis (FSME) und die Borreliose stellen die bedeutendsten von Zecken übertragenen Zoonosen in Europa dar (Süss et al. 2008). Die humane granulozytäre Anaplasmose (HGA) erlangte jüngst humanpathologische Bedeutung (Woldehiwet 2009).

Die FSME wird durch Frühsommermeningoenzephalitis- Viren (FSMEV) hervorgerufen, stellt mit circa 12.000 Neuerkrankungen pro Jahr europaweit die am häufigsten durch Zecken übertragene Arbovirose dar und ist meldepflichtig. FSMEV sind in Deutschland weit verbreitet. Gebiete, in denen FSMEV endemisch vorkommen, werden durch das Robert Koch- Institut (RKI) in Risikogebiete eingeteilt. Im Jahre 2008 überarbeitete das RKI die Definition für Risikogebiete. Seither werden sie anhand von Erkrankungsinzidenzen bestimmt. Das Vorkommen von Risikogebieten ist bundesweit bisher auf Süd- und Mitteldeutschland beschränkt, in Niedersachsen ist kein Risikogebiet verzeichnet. Dennoch wurden von 2001 bis 2010 24 FSME-Erkrankungsfälle registriert, von denen vier definitiv autochthone Erkrankungen waren. Zwei dieser Erkrankungsfälle aus den Jahren 2004 und 2007 stammten aus der Region Wingst im Landkreis Cuxhaven. Dies führte zu der Annahme, dass die Zeckenpopulation dieses Naherholungsgebietes möglicherweise mit FSMEV infiziert sein könnte.

*Anaplasma phagozytophilum* (*A. phagozytophilum*) ist als Erreger der HGA erst jüngst in das humanpathogene Blickfeld gerückt. Acht Jahre nach der Erstbeschreibung des Weidefiebers bei Schafen, Rindern und Ziegen im Jahre 1932 erfolgte die Bestimmung dieses Erregers. Erst 1994 wurde die humane Erkrankung in den USA diagnostiziert. Sie ist eine Erkrankung, die oft asymptomatisch oder mit unspezifischen Allgemeinsymptomen auftritt (Woldehiwet 2009). Bis heute konnte die HGA in Europa nur sporadisch verzeichnet werden. In Deutschland wurde eine akute Erkrankung bisher nicht diagnostiziert. Dennoch konnten in serologischen Untersuchungen beispielsweise von Blutspendern in 2,1 % der Fälle Antikörper detektiert werden. Vereinzelt Untersuchungen von Zeckenpopulationen in Deutschland zeigten das Vorhandensein von *A. phagozytophilum* (Kowalski et al. 2006).

Die Lyme- Borreliose ist mit schätzungsweise mehr als 60.000 Erkrankungen bundesweit pro Jahr die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung (Monazahian 2010, Huppertz 1999, Plettenberg et al. 2007). Sie wird durch *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s. l.) hervorgerufen. *B. burgdorferi* s. l. ist bundesweit verbreitet. Im Gegensatz zur FSME besteht lediglich in den Bundesländern Berlin, Brandenburg, Mecklenburg- Vorpommern, Sachsen- Anhalt, Sachsen und Thüringen eine Meldepflicht für die Borreliose. Die Lyme- Borreliose ist eine

Multisystemerkrankung, die Haut, Gelenke, das Nervensystem und gegebenenfalls sogar die Augen betreffen kann. Gegen die Lyme- Borreliose besteht im Gegensatz zur FSME keine prophylaktische Impfung. Daher ist es von Wichtigkeit, das Durchseuchungsausmaß der Zeckenpopulation zu kennen, um die Diagnose Lyme- Borreliose gegebenenfalls zügig in Betracht zu ziehen und zu behandeln.

## **1.1 Frühsommermeningoenzephalitis**

Die FSME ist eine durch FSMEV ausgelöste Infektionskrankheit. Nach dem Erstbeschreiber der Erkrankung als Schneidersche Krankheit seit 1927 bekannt, wurde die Krankheit im Laufe der Zeit unter anderem nach ihrem Vorkommen in Zentraleuropa als Zentraleuropäische Enzephalitis, nach ihrem charakteristischen Verlauf als biphasische Meningoenzephalitis oder durch ihre Erregerherkunft als biphasisches MilCHFieber benannt. Die im deutschen Sprachgebrauch übliche Bezeichnung FSME ist auf das jahreszeitlich gehäufte Auftreten zurückzuführen. Im angelsächsischen Raum wird der Begriff Tick- borne Enzephalitis (TBE) auf Grund der Übertragung durch Zecken verwendet (Janitzka- Futterer 2003).

Hierzulande stellt die Zeckenart *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) als Vektor des europäischen Virensubtyps die Hauptinfektionsquelle dar. Die alimentäre Übertragung durch den Verzehr von Rohmilch ist nur von untergeordneter Bedeutung. In Europa ist die FSME die bedeutendste virale Zoonose. Auch in Teilen Deutschlands kommt sie endemisch vor (Stark et al. 2009, Holzmann et al. 2009, Balogh et al. 2009).

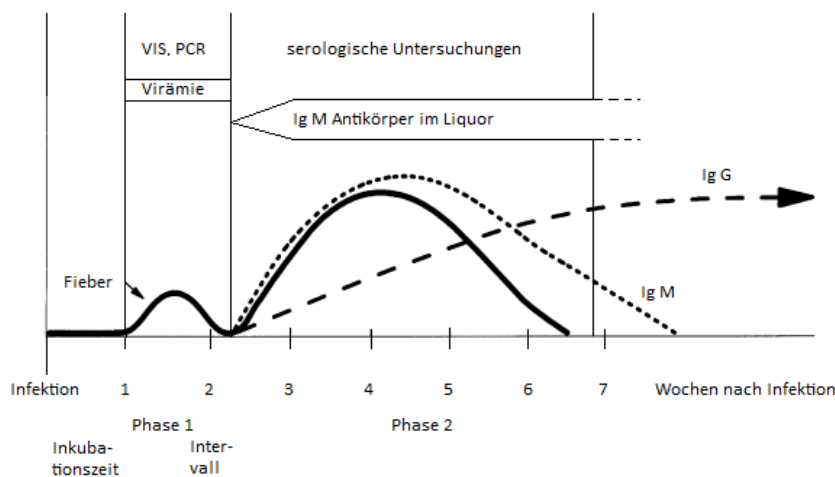
### **1.1.1 Das Krankheitsbild der Frühsommermeningoenzephalitis**

Das Krankheitsbild der FSME kann beim Menschen sehr variieren. In zwei Dritteln aller Fälle verläuft die Infektion klinisch inapparent oder wird auf Grund ihres subklinischen Verlaufs, ähnlich einem grippalen Infekt, nicht erkannt. Bei klinisch auffälligen Patienten ist mehrheitlich ein biphasischer Verlauf zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von durchschnittlich einer Woche (2- 28 Tage) beginnt das Prodromalstadium, das mit einem allgemeinen Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen, Fieber und gelegentlich Bauchschmerzen einhergeht. In dieser Zeit ist der Patient virämisch. Ein nachfolgendes symptomfreies Intervall von bis zu drei Wochen wird in 50 % der Fälle von einer Meningitis, in 40 % von einer Meningoenzephalitis und in 10 % von einer Meningoenzephalomyelitis unterbrochen (Kaiser 1999). Die Hirnhautentzündung verläuft ähnlich anderen viralen Meningitiden und ist unter anderem durch Fieber, Kopfschmerz, Nackensteifigkeit, Übelkeit, Erbrechen und starker Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens gekennzeichnet. Bei einer Hirnentzündung, die meist in Kombination mit einer Hirnhautentzündung als Meningoenzephalitis einhergeht, treten zusätzlich Bewusstseins- und Koordinationsstörungen sowie Lähmungen von Extremitäten und Hirnnerven auf. Die Meningoenzephalomyelitis als schwerste Verlaufsform manifestiert sich durch Befall der Rückenmarks- Vorderhörner mit schlaffen Lähmungen der Extremitätenmuskulatur. Wenn zusätzlich der Hirnstamm betroffen ist, treten Schluck- und Sprechstörungen oder Lähmungen der

Gesichts-, Hals oder Atemmuskulatur auf (Kaiser 2007, Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008 a).

### 1.1.2 Diagnostik, Therapie und Prognose der Frühsommermeningoenzephalitis

Einen Hinweis auf eine Infektion mit FSMEV gibt zum einen die Anamnese mit Aufenthalt in einem Risikogebiet, gegebenenfalls mit erinnerlichem Zeckenstich, zum anderen die klinische Manifestation. Da die Anamnese und die Klinik zu unspezifisch für einen eindeutigen Beweis auf eine Infektion sind, wird im Labor die serologische Untersuchung auf FSMEV- spezifische IgG- und IgM- Antikörper mittels neuer molekularbiologischer Untersuchungsmethoden wie eines Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA) hinzugefügt. Ein Nachweis beider Antikörper ist notwendig, um eine Diagnose auf Grundlage des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) zu stellen, und in Deutschland zudem meldepflichtig. Allerdings ist zu beachten, dass Kreuzreaktivitäten durch Antikörper, gebildet zum Beispiel durch Impfungen gegen das Gelbfieber- Virus, zu einem falsch positiven Ergebnis im ELISA führen können. So ist ein positiver Nachweis im ELISA durch einen Neutralisations- Test zu bestätigen. Da die Neutralisationstests jedoch sehr aufwändig sind und das Hantieren mit infektiösem Virus voraussetzen, werden sie nur in speziellen Labors durchgeführt. Nach einer durchgemachten Infektion sind Antikörper verbunden mit einer Immunität lebenslang nachweisbar. Den Verlauf der Antikörperbildung zeigt Abbildung 1. Ein



**Abbildung 1: Biphasischer Verlauf der FSME, Bildung spezifischer Antikörper und ihr Nachweis im Blut und Liquor (nach Holzmann 2003, Seite 36). VIS: Virusisolation, PCR: Polymerase- Kettenreaktion**

Nachweis von FSMEV mit der molekularbiologischen Untersuchungsmethode Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist für die Diagnostik der FSME nicht Methode der Wahl. Sie könnte eine

Erkrankung im virämischen Stadium nachweisen. In schweren Fällen kann der Nachweis aus Liquor, Hirn oder anderen Geweben gelingen.

Gegen die FSME bestehen keine kausalen Therapieoptionen. Daher beschränkt sich das weitere Vorgehen auf supportive Maßnahmen, wie strikte Bettruhe, adäquate Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Nahrungszufuhr, hinreichend starke Analgesie und Fiebersenkung. Die meningitidische Form heilt meist folgenlos aus. Je heftiger der Verlauf der akuten Phase, desto häufiger treten Residuen wie neurasthenische Beschwerden mit Kopfschmerzen, Müdigkeit, verminderter Belastbarkeit und emotionaler Labilität sowie Konzentrations-, Gedächtnisstörungen und Lähmungen auf (Kaiser 2007, Kunze 2007, Mickiene 2007, Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008 a, Bogovic et al. 2010).

Bei etwa 1 % aller Patienten endet die Erkrankung letal, bei Patienten mit Meningoenzephalomyelitis in bis zu 3 %. In Ländern, in denen der sibirische FSME- Subtyp vorherrscht, wird von einer vielfach höheren Letalität von bis zu 5- 20 % berichtet (Barrett et al. 2008).

### **1.1.3 Epidemiologie der Frühsommermeningoenzephalitis**

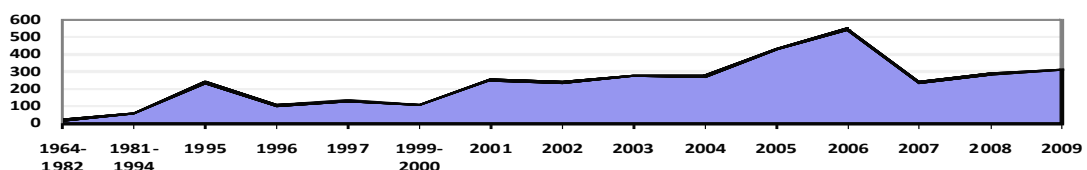
Durch das verbreitete Vorkommen von FSMEV ist die FSME endemisch in Europa und Asien weit verbreitet. Geographisch gesehen sind es die Gebiete von Elsass- Lothringen im Westen und Wladiwostok im Osten, die nördlichen und östlichen Teile Chinas und Hokkaido in Japan. Die in Europa vorherrschende Zeckenart *I. ricinus* überträgt ausschließlich den westlichen Subtyp der FSMEV (Charrel et al. 2004, Barrett et al. 2008).

Schon seit 1976 wird das Vorkommen der FSME in Europa und Russland dokumentiert. Insgesamt konnte bisher in mehr als 20 europäischen Staaten das Auftreten der FSME verzeichnet werden. Dabei fallen die höchsten Infektionsraten auf Osteuropa, genauer auf das Baltikum. Zudem ist die Erkrankung in Skandinavien und mitteleuropäischen Staaten wie Österreich und Deutschland häufig. In den Jahren von 1976 bis 1989 konnten in Europa mehr als 20.000 beziehungsweise einschließlich Russland knapp 40.000 Fälle von FSME verzeichnet werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen jährlichen Inzidenz von 1.452 beziehungsweise 2.755 Erkrankungsfällen. In den Jahren 1990 bis 2007 stieg die Zahl der Fälle in Europa einschließlich Russland auf 157.584 an. Dies entspricht einer durchschnittlichen jährlichen Inzidenz von 8.755. Der Vergleich beider Zeiträume ergibt einen Anstieg der jährlichen Inzidenz um knapp 320 %. Sie unterliegt allerdings starken Schwankungen. So konnte im Jahre 2006 in Europa ein maximales Auftreten seit 1995 registriert werden. Insgesamt ist die genaue endemische Situation aber auf Grund

unterschiedlicher Verfahren der FSME- Fall- Registrierung und vor allem unterschiedlicher Fall- Definitionen nur abschätzbar (Süss 2008 b).

In Ländern mit endemischem Vorkommen von FSMEV ist die Inzidenz von steigender Tendenz. Österreich nimmt eine Sonderstellung ein. Auf Grund von sehr hohen Erkrankungszahlen von jährlich 426 Patienten zwischen 1976 und 1980 wurde 1981 mit einer flächendeckenden landesweiten Impfung gegen FSME begonnen. Mit Durchimpfungsraten von bis zu 90 % konnte die Inzidenz auf durchschnittlich 62 Patienten zwischen 2000 und 2004 pro anno gesenkt werden (Robert Koch- Institut 2005, Mansfield et al. 2009).

In Deutschland sind FSMEV in südlichen Gebieten endemisch verbreitet. Erstmals wurde eine Erkrankung durch FSMEV 1959 in den heutigen neuen Bundesländern beschrieben. In Westdeutschland folgten erste Fälle ab 1969 bei Passau und Freiburg im Breisgau (Edigkauer und Gniel 2005). Da erst seit 2001 eine Meldepflicht für FSMEV gilt, stammen die Daten bis 2000 aus den zusammengetragenen Sammlungen deutscher Forscher (Robert Koch- Institut 2006). Die Inzidenz der FSME ist ansteigend, Abbildung 2 gibt dazu näheren Aufschluss.



**Abbildung 2: Durchschnittliche 1- Jahres- FSME- Inzidenzen zwischen 1964 und 2009 (Ackermann 1986, Robert Koch- Institut 1998, Robert Koch- Institut- 2001, Robert Koch- Institut- 2002, Robert Koch- Institut- 2003, Robert Koch- Institut- 2004, Robert Koch- Institut- 2005, Robert Koch- Institut- 2006, Robert Koch- Institut- 2007 c, Robert Koch- Institut- 2008, Robert Koch- Institut- 2009, Robert Koch- Institut- 2010).**

Die epidemiologischen Aufzeichnungen sind in Deutschland präzise, da laut IfSG seit 2001 bei klinischem und labordiagnostischem Nachweis eine namentliche Meldepflicht an das RKI besteht. Die ist entweder direkt durch einen Nukleinsäurenachweis (RNA) mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden wie der PCR oder indirekt durch den Nachweis von FSME-spezifischen Antikörpern der Fall. Auf Grund dieser an das RKI übermittelten Daten werden bundesweit Risikogebiete ermittelt. Risikogebiete sind Gebiete, in denen ein Erkrankungsrisiko für exponierte Personen besteht. 2007 wurde die Definition für FSME- Risikogebiete überarbeitet. Seither werden Risikogebiete nach Stadt- oder Landkreis- bezogenen Inzidenzen ermittelt. Weiterhin entfällt die vorherige Aufteilung in Risiko- und Hochrisikogebiete. Ein Kreis wird heute als Risikogebiet definiert, wenn die Anzahl der FSME- Erkrankungen in ihm oder in ihm und allen



seinen angrenzenden Kreisen in einem 5- Jahresintervall signifikant größer ist als eine Erkrankung pro 100.000 Einwohner. Eine Impfpflicht laut Ständiger Impfkommision (STIKO) besteht lediglich für Personen, die in definierten FSME- Risikogebieten zeckenexponiert sind, gleich ob als Tourist, Einwohner oder Berufstätiger (Robert Koch- Institut 2009, Robert Koch- Institut 2006).

Niedersachsen zählt derzeit nicht zu den vom RKI definierten Risikogebieten. Dennoch wurden in den Jahren 2001 bis 2010 24 FSME- Erkrankungsfälle von 10 Gesundheitsämtern registriert. In 16 Fällen wurde entweder eine in Niedersachsen erworbene Infektion auf Grund eines vorherigen Aufenthalts in Risikogebieten ausgeschlossen oder es konnte kein Aufenthaltsort bestimmt werden. In den verbleibenden neun Fällen musste von einer Infektion in Niedersachsen ausgegangen werden. Doch lediglich zwei dieser Fälle erfüllen die Falldefinition des IfSG komplett. Auf Grundlage dieser Daten entspricht Niedersachsen nicht den Bestimmungen des RKI für ein Risikogebiet. Folglich gibt es bisher von der STIKO keine Impfpflicht für dieses Bundesland. Um ein etwaiges Infektionsrisiko besonders für stark Exponierte zu ermitteln, wird seit 2006 vom Niedersächsischen Landesgesundheitsamt (NLGA) eine Seroprävalenzstudie mit zweijährlichem Follow- Up bei niedersächsischen Wald- und Forstarbeitern durchgeführt. Bei dieser Studie ließen sich 83 % aller Mitarbeiter der Niedersächsischen Landesforsten beziehungsweise der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW- FVA) freiwillig untersuchen. Sie besteht zum einen aus einer Blutuntersuchung auf FSME- spezifische IgG- Antikörper und zum anderen aus einem Fragebogen bezüglich Berufs- und Reisetätigkeit, Freizeitverhalten, Impfungen etc.. Bei mehr als 65 % der Probanden konnten keine Antikörper nachgewiesen werden. Bei den verbleibenden Mitarbeitern konnten die nachgewiesenen Antikörper durch ein Referenzlabor mittels Neutralisationstest alle auf eine zurückliegende FSME- Impfung zurückgeführt werden. So gab es bei keinem der Probanden einen Hinweis auf eine autochthon erworbene Infektion (Niedersächsisches Landesgesundheitsamt 2007). Ein erstes Follow- Up spiegelt das Ergebnis der ersten Studie wider (Monazahian et al. 2010).

Zur Einschätzung des Infektionsrisikos werden seit einigen Jahren Zeckenpopulationen in größerem Maßstab untersucht, flächendeckende Untersuchungen stehen aus. Vor allem in Süddeutschland gibt es Untersuchungen von eng umgrenzten Gebieten. Neben einer Untersuchung der Durchseuchungsrate von Zecken kann eine Untersuchung der Seroprävalenz weiteren Aufschluss über die Aktivität in Naturherden und damit das Erkrankungsrisiko bei Exponierten geben.

### 1.1.4 Systematik, Morphologie und Genom von Frühsommermeningoenzephalitis-Viren

FSMEV werden unter anderem zusammen mit dem Gelbfieber-, dem Dengue- und dem Japanische- Enzephalitis- Virus zur Familie der Flaviviridae gezählt (Modrow et al. 2010). Namensgebend für diese Virenfamilie ist das Gelbfiebervirus. FSMEV werden in den Europäischen, den Sibirischen und den Fernöstlichen Subtyp eingeteilt (Calisher et al. 1989, Clarke 1964, Ecker et al. 1999). Die meisten Flaviviren werden als virale Zoonosen durch Arthropoden, also Stechmücken oder Zecken, übertragen. Daher werden sie auch als ARBO- Viren, einer Abkürzung für *arthropod- borne*, bezeichnet (Falke 2009).

FSMEV sind Lipid- umhüllte RNA- Viren mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Ihre einzelsträngige RNA ist circa 11.000 Nukleotide groß und positiver Polarität. Sie kodiert für Struktur- und Nicht- Strukturproteine. FSMEV beinhalten lediglich drei verschiedene Strukturproteine: das C (Capsid)-, M (Membrane)- und E (Envelope)- Protein (siehe Abbildung 3).

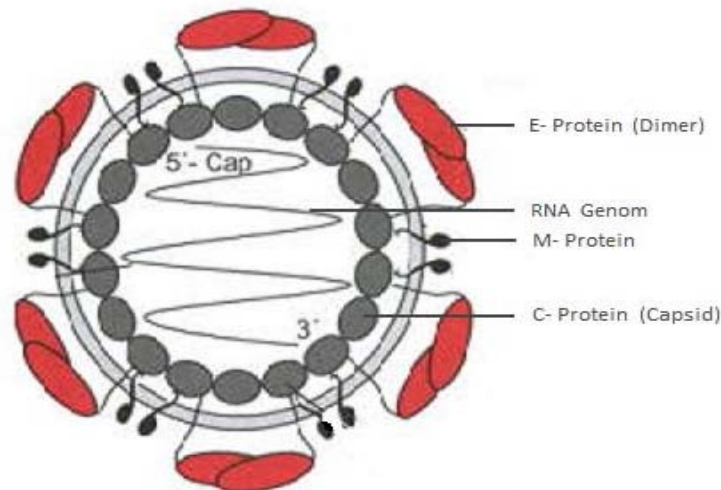


Abbildung 3: Aufbau von FSMEV (nach Modrow et al. 2010, Seite 198).

Das C Protein bildet die Kapside des ikosaedrischen Kapsomers, das die virale RNA umgibt. Protein- E und -M sind Bestandteile der viralen Membran. Das wichtigste Oberflächenprotein der Viren, das Glykoprotein E, ist sowohl für die Fusion des Virus mit der Zellmembran als auch für die Antigenität und somit die entstehende Immunität verantwortlich (Lindenbach et al. 2007). Im Jahr 1991 gelang es der Arbeitsgruppe Heinz et al., eine lösliche, kristallisierbare Form des E- Proteins zu isolieren, sodass seine dreidimensionale Struktur dargestellt werden konnte. Das Protein- M spielt in der Virusreifung eine wichtige Rolle.

Die sieben Nicht- Strukturproteine- Gene (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5) von FSMEV kodieren unter anderem für eine Helikase und eine RNA- abhängige RNA- Polymerase (Heinz et al. 2000, Chambers et al. 1990).

Flaviviren unterliegen, ähnlich vielen RNA- Viren, gewöhnlich einer hohen Mutationsrate. Anhand von Sequenzierungen des Strukturprotein- E- Gens untersuchten Ecker et al. 1999 die phylogenetische Verwandtschaft verschiedener FSMEV- Subtypen. Hier zeigte sich eine Variabilität auf dem Level der Aminosäuren des E- Proteins von maximal 2,2 % innerhalb der Subtypen und von maximal 5,6 % zwischen den Subtypen.

## **1.2 Der Vektor *Ixodes ricinus***

Zecken gehören unter den Gliederfüßlern (Arthropoden) zur Klasse der Spinnentiere (Arachnida). Zu ihnen gehören die Familien der Lederzecken (Argasidae), der Schildzecken (Ixodidae) und die Familie Nuttalliellidae. Unter den ungefähr 880 bekannten Zeckenarten nimmt die Schildzecke *I. ricinus*, auch „Gemeiner Holzbock“ genannt, als häufigste Art eine herausragende Stellung ein (Eckert et al. 2008, Nava et al. 2009, Parola und Raoult 2001, Sonenshine 1991).

*I. ricinus* fungiert als parasitierender Vektor verschiedener, auch humanpathogener Krankheitserreger. Das bedeutet, dass er verschiedene Pathogene auf Wirtstiere, und gegebenenfalls auch auf den Menschen, übertragen kann. Dabei gilt der Organismus als Wirt, der einen anderen Organismus aufnimmt und ihm als lebenswichtige Nahrungsquelle dient. Parasitismus bedeutet, dass der Wirt umgekehrt keinen Nutzen aus dem Erreger zieht. Als obligat hämatophager Ektoparasit ernährt sich *I. ricinus* von Blut und anderen Gewebsbestandteilen seines Wirts. Dabei ist diese Zeckenart weder an umgrenzte Biotop (euryök) noch an ein eng umgrenztes Wirtsspektrum (euryphag) gebunden. Eine Übertragung des Erregers auf den Wirt findet durch Inokulation von Speichel statt. Die kontinuierliche Speichelabgabe von *I. ricinus* an seinen Wirt bewirkt zum einen eine Konzentration des gesogenen Bluts in der Zecke und zum anderen eine Entfernung toxischer Substanzen (Eckert et al. 2008, Liebisch und Liebisch 2003, Parola und Raoult 2001, Süß 2008 a). Je länger die Saugdauer, desto wahrscheinlicher wird die Übertragung von Erregern zwischen den Wirten und *I. ricinus*. Sobald eine Übertragung stattgefunden hat, werden die Wirte von *I. ricinus* ebenfalls zu Wirten der übertragenen Pathogene. In diesem Zusammenhang wird zwischen Reservoirwirt und Endwirt unterschieden. Reservoirwirte sind als Wirte soweit an das Pathogen angepasst, als dass sie von ihm nicht geschädigt werden und ihm vor allem zur Vermehrung dienen. Im Gegensatz zum Reservoirwirt ist

der Endwirt nicht an das Pathogen angepasst und wird folglich von ihm geschädigt oder gar getötet (Campbell und Reece 2009).

Krankheitserreger können nicht nur vom Vektor auf den Wirt oder umgekehrt übertragen werden, sondern auch zwischen den Vektoren. Die Übertragung des Erregers zwischen den Vektoren kann transstadial, transovariell, über Simultan- oder über sexuelle Infektion erfolgen. Bei der transstadialen Übertragung persistiert der Erreger im individuellen Vektor über seine Entwicklungsstufen hinweg. Das bedeutet für *I. ricinus*, dass eine im Larvenstadium infizierte Zecke auch als Adulte den Erreger in sich trägt. Bei der transovariellen Übertragung gibt das adulte Weibchen den Erreger auf seine Eier weiter, sodass die Larven der darauf folgenden Generation ebenfalls den Erreger in sich tragen. Eine Simultaninfektion findet statt, wenn zwei Zecken, von denen nur eine den Erreger in sich trägt, gleichzeitig an einem Wirt saugen. Eine lokale Ausbreitung des Erregers im Wirt führt zu einer Infektion der zweiten Zecke. Die sexuelle Übertragung findet bei der Kopulation vom Weibchen auf das Männchen oder umgekehrt statt (Eckert et al. 2008, Hayes et al. 1980, Hua et al. 2003, Stanek et al. 1986).

Durch das zusätzlich zu den zahlreichen Übertragungswegen häufig stark ausgeprägte Ausmaß der Zeckendurchseuchung ist *I. ricinus* ein idealer Vektor für die verschiedensten Pathogene, zu denen Viren wie FSMEV, Bakterien wie *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* und Protozoen wie die Babesien zählen (Liebisch und Liebisch 2003, Parola und Raoult 2001). Auf Grund der großen Vielzahl an Krankheitserregern muss auch der Aspekt der Mischinfektion bedacht werden. Als typische Erregerkombinationen konnten Kombinationen zwischen FSMEV und *B. burgdorferi* s. l., zwischen den verschiedenen *B. burgdorferi* s. l.- Spezies oder zwischen *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* beobachtet werden (Alekseev et al. 2004). Dabei ist eine gegenseitige Beeinträchtigung der Erreger nicht bekannt (Korenberg 1999). Aus humanmedizinischer Sicht ist eine Mischinfektion in Betracht zu ziehen, da sie zu unstenen und widersprüchlichen Symptomen und diagnostischen Ergebnissen führen kann (Demaerschack et al. 1995, Owen 2006, Rijpkema et al. 1997, Swanson et al. 2006, Belongia 2002).

*I. ricinus* beherbergt neben der großen Anzahl von Pathogenen auch Symbionten wie *Candidatus Midichloria mitochondrii* (*C. Midichloria m.*). Dieses gram negative, intrazellulär in Ovarialzellen lebende Bakterium kommt entweder frei im Zytoplasma vor oder dringt in die Mitochondrien ein und gehört in der Ordnung der Rickettsiales zu der Familie der Anaplasmataceae. In Studien konnten Durchseuchungsraten von *I. ricinus* von bis zu 100 % der weiblichen Adulten und 44 % der männlichen Adulten gefunden werden (Sassera et al. 2008).

## Morphologie, Entwicklungsstadien, Wirtstiere und Verbreitung von *Ixodes ricinus*

Morphologisch wird *I. ricinus* in einen Körper- und einen Kopfbereich unterteilt. Der Kopfbereich, auch Gnathosoma oder Capitulum genannt, besteht aus dem Mundwerkzeug. Vom Körper, dem Idiosoma, der Adulten und der Nymphen gehen vier, von dem der Larven drei Beinpaare ab. Der Tarsus des ersten Beinpaars trägt das Hallersche Organ mit Sensillen für Vibration, Temperatur und einige volatile Substanzen wie CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S, Ammonium, Sexualpheromone und andere Duftstoffe (Eckert et al. 2008, Sonenshine 1991, Liebisch und Liebisch 2003, Wirtz 2001).

*I. ricinus* durchläuft in seinem postembryonalen Leben drei Stadien: Larve, Nymphe und adultes Weibchen beziehungsweise adultes Männchen. Die Entwicklung jedes einzelnen Stadiums dauert mindestens ein, maximal fünf Jahre. Das Weibchen ist mit 3 mm Länge das größte der ungesogenen Stadien (ohne Blutmahlzeit), gefolgt von den Männchen mit 2,5 mm, den Nymphen mit 1,5 mm und den Larven mit 0,5 mm Länge (siehe Abbildung 4). Durch den Saugakt, bei dem das Weibchen bis zu dem 200- Fachen seines Gewichtes erreicht, wächst es auf 1 cm Länge und ändert seine Farbe in stahlgrau (Eckert et al. 2008, Liebisch und Liebisch 2003). Eine nüchterne Zecke kann bis zu mehrere Jahre ohne Blutmahlzeit überleben (Sonenshine 2003). Sie verbringt weniger als 10% ihrer Lebenszeit auf ihrem Wirt (Parola und Raoult 2001).

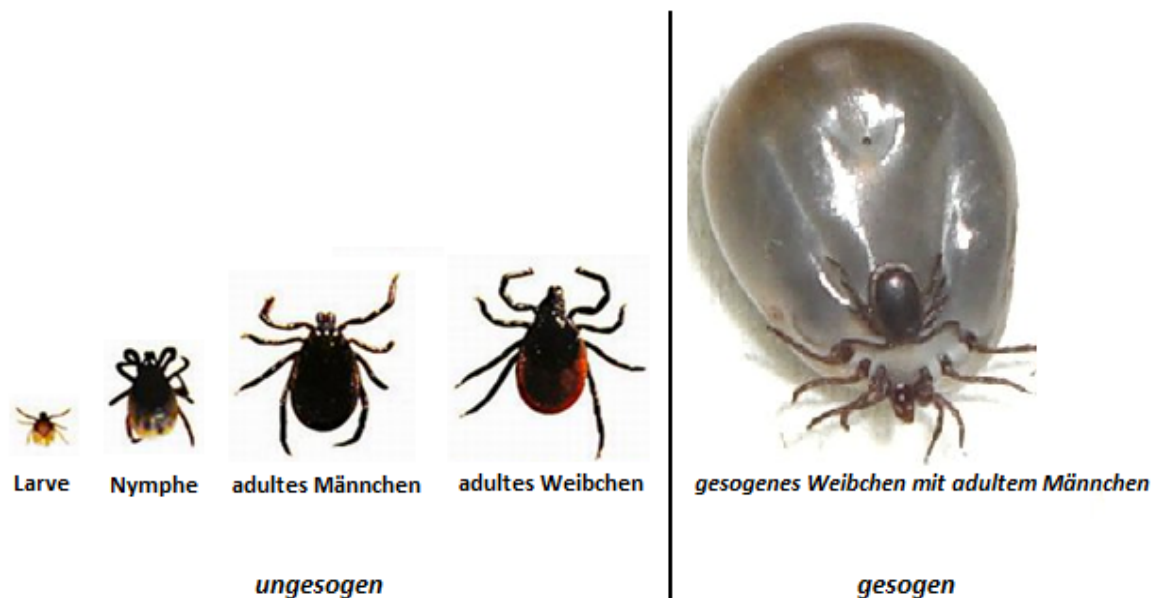


Abbildung 4: Die verschiedenen Stadien von *I. ricinus* im gesogenen und ungesogenen Zustand (<http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/65.htm>, 29. 10. 2010).

Die Zecke ist dreiwirtig. Das heißt, sie muss für den Übertritt in das jeweils nächste Entwicklungsstadium eine Blutmahlzeit zu sich nehmen und lässt sich dazu auf zwei verschiedenen Wirten nieder (Martini 1946, Sonenshine 1991). Sie ist auf ein sehr breites

Wirtsspektrum angepasst, das sich aus mehr als 200 Wirbeltierarten, wie Säugern, Vögeln und Reptilien zusammensetzt (Eckert 2008, Gern et al. 1998, Sparagano et al. 1999). Da sich die verschiedenen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* bevorzugt in verschiedenen Höhen der Vegetation aufhalten, ergibt sich für die einzelnen Stadien ein verschiedenes Wirtstierspektrum. So sind bevorzugte Wirtstiere der Larven- Zecken die Rötel-, Gelbhals- und Waldmaus, die der Nymphen- und adulten Zecken Rehe, aber auch der Mensch (Liebisch und Liebisch 2003, Süss und Schrader 2004). Naht ein geeigneter Wirt heran, lässt sich die Zecke für den Saugakt von ihm abstreifen. Dieser dauert je nach Entwicklungsstadium zwischen drei Tagen und zwei Wochen. Nach dem dritten Saugakt des Weibchens lässt es sich zur Eiablage zu Boden fallen (Wirtz 2001).

Abiotische Faktoren wie eine Lufttemperatur über 7 °C und eine Luftfeuchtigkeit von mindestens 75 % aktivieren die Zecke für die Wirtsfindung. Geographisch kommt diese Zeckenart deshalb von Südkandinavien bis nach Nordafrika und von Portugal bis zum Kaspischen Meer vor. In Deutschland kann man den Holzbock von März bis November von der Nordsee bis zu den Alpen bis zu einer Höhenlage von 2000 m ü. NN. finden. Je nach Wetterverlauf zeigt die Aktivitätsdynamik von *I. ricinus* eine mehr oder weniger gut ausgeprägte bimodale Aktivitätsdynamik mit Maxima im Frühling und Herbst (Liebisch und Liebisch 2003).

### **1.3 Weitere durch *Ixodes ricinus* übertragene Erkrankungen**

*I. ricinus* ist Vektor für eine Vielzahl humanpathogener Erkrankungen. Neben der FSME ist die Borreliose in Europa die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung. Die HGA ist dagegen erst in jüngerer Zeit bekannt geworden: Sie wurde bisher in verschiedenen Ländern Europas und in den USA diagnostiziert. Weitere durch Zecken übertragene Erkrankungen sind Rickettsiosen wie das Rocky Mountain Spotted Fever, das Q- Fieber, die Tularämie oder die Brucellose (Süss und Schrader 2004, Hildebrandt 2002).

#### **1.3.1 Humane Granulozytäre Anaplasrose**

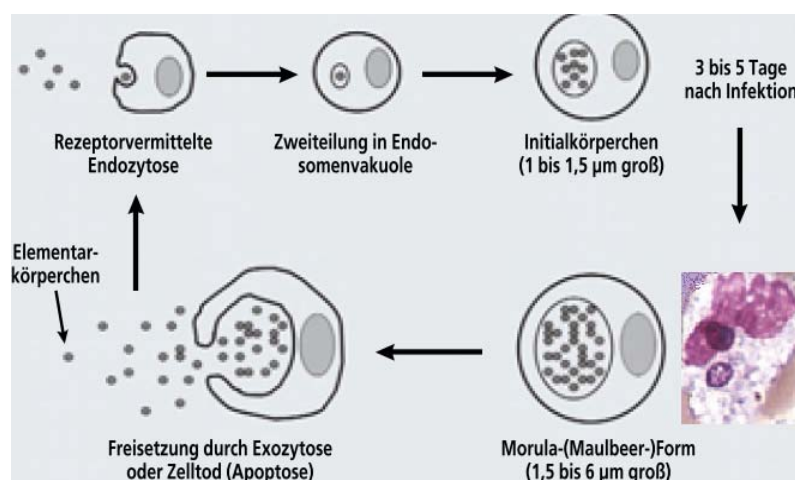
Die HGA wird durch das Bakterium *A. phagozytophilum* ausgelöst. Diese in neuer Zeit aufgetretene, durch Zecken übertragene Infektionskrankheit ist die in Nordamerika nach der Lyme- Borreliose am zweit häufigsten vorkommende Zoonose (Dumler et al. 2005).

##### **1.3.1.1 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie der humanen granulozytären Anaplasrose**

Die meisten der Infektionen mit *A. phagozytophilum* verlaufen klinisch inapparent. Eine klinisch manifeste Erkrankung geht nach einer etwa einwöchigen Inkubationszeit mit unspezifischen

grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien sowie einem geschwächten Allgemeinbefinden einher. In seltenen Fällen sind der Magendarmtrakt - mit Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Anorexie - oder die Atemwege mit Husten und pulmonalen Infiltraten oder die Konjunktiven betroffen. Begleitend konnten Leukopenien, Thrombozytopenien, Anämien und erhöhte Transaminasewerte beobachtet werden. In Europa scheint die Erkrankung einen mildereren, das heißt nach einigen Tagen selbstlimitierenden Verlauf zu nehmen und weiterhin konnte bisher aus keinem Patientenserum *A. phagozytophilum* kulturell angezchtet werden, es wurde kein Todesfall gemeldet. Im Zusammenhang mit opportunistischen Erkrankungen führte die HGA in den USA in einigen Fällen bereits zum Tode (Dumler et al. 2005, Bakken und Dumler 2000, Blanco und Oteo 2002, Weber et al. 2000).

Beim Auftreten der oben genannten unspezifischen klinischen Symptome und der hämatologischen Laborbefunde muss eine HGA bedacht werden. Zur Sicherung der Diagnose werden spezifische Laboruntersuchungen eingeleitet. Diese können vor Einleitung der Therapie aus der kulturellen Anzucht des Erregers oder aus dem Nachweis seiner DNA bestehen. Weiterhin bietet sich noch während der symptomatischen Phase der mikroskopische Direktnachweis von Morulae an. Morulae sind zytoplasmatische Einschlusskörperchen in neutrophilen Granulozyten, in einem Blutausstrich gefärbt nach Giemsa oder Wright. Nach Wright gefärbte neutrophile Granulozyten mit intrazellulären Morulae sind zusammen mit dem Vermehrungszyklus von *A. phagozytophilum* in Abbildung 5 dargestellt. Diese Methode stellt sich zwar als zügigste heraus,



**Abbildung 5: Nach Wright gefärbte neutrophile Granulozyten mit intrazellulären Morulae und der Lebenszyklus von *A. phagozytophilum* (nach Dumler et al. 2005, Seite 1829 sowie Baumgarten et al. 2000, Seite 2458).**

kann aber gegebenenfalls durch das karge Auftreten der Morulae oder durch fehlerhaft interpretierte Thrombozytenüberlagerungen zu falsch negativen oder positiven Ergebnissen führen. Daher bietet sich als sensitivere Methode die serologische Untersuchung auf spezifisch gebildete frühe IgM- und späte IgG- Antikörper mittels eines Immunfluoreszenztests (IFT) an.

Beweisend ist hierbei nicht der alleinige Nachweis der Antikörper, sondern ein Titeranstieg (Wormser et al. 2006). Bei Verdacht auf eine HGA soll eine empirische Antibiotikatherapie mittels Doxycyclin eingeleitet werden, um das Auftreten opportunistischer Infektionen zu verhindern (Bakken und Dumler 2000, Wormser et al. 2006, Thomas et al. 2009).

#### **1.3.1.2 Epidemiologie der humanen granulozytären Anaplasrose und *Anaplasma phagozytophilum***

Die HGA ist in Nordamerika, Afrika, Asien und Europa verbreitet (Dumler et al. 2005, Inokuma et al. 2005, Park et al. 2003). Schon seit langem als veterinärmedizinische Erkrankung bekannt, wurde sie doch erst 1994 erstmals als Infektion des Menschen in den USA beschrieben (Chen et al. 1994). Die Aufzeichnungen über die Inzidenz der Erkrankung sind unvollständig und werden dort mit 1,4 Fällen auf 1.000.000 Einwohner jährlich angegeben (Demma et al. 2005). In seroepidemiologischen Studien wurden Prävalenzen von *A. phagozytophilum*-spezifisch gebildeten Antikörpern mit einer Prävalenz von 11 bis 30,1 % in der Bevölkerung von Endemiegebieten gefunden (Baumgarten et al. 2000).

In Europa wurde die HGA erstmals 1996 in Slowenien nachgewiesen, hier gibt es derzeit die größte Anzahl an Erkrankungsfällen. Weitere vereinzelte Erkrankungsfälle wurden seither in den Niederlanden, in der Schweiz, in Spanien, Schweden, Norwegen, Kroatien, Österreich und Polen beschrieben (Petrovec et al. 1997, Blanco und Oteo 2002, Walder et al. 2003). In Europa konnte die Diagnose der HGA bisher nur durch den Nachweis spezifisch gegen *A. phagozytophilum* gebildeter Antikörper und durch den Nachweis seiner DNA mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden gesichert werden, eine Erregeranzucht aus menschlichem Blut war bisher nicht möglich (Blanco und Oteo 2002). In Studien wurde eine Seroprävalenz der Antikörper gegen *A. phagozytophilum* von bis zu 28 % beschrieben, mit durchschnittlichen Werten zwischen 0 und 1,5 % der Normalbevölkerung und 3,8 bis 19,5 % bei Risikopersonen wie zum Beispiel Waldarbeitern (Strle 2004, Baumgarten et al. 2000). Ein Unterschied der klinischen Erscheinungsform scheint im Verlauf der Erkrankung zwischen den Kontinenten mit einem mildereren Verlauf in Europa im Gegensatz zu den USA zu liegen (Blanco und Oteo 2002).

In Deutschland sind Fälle der HGA nur aus der Veterinärmedizin, zuerst 1984 bei einem Pferd, bekannt (Messerer 2006). Zur Abschätzung der Verbreitung von *A. phagozytophilum* und somit einer Risikoabschätzung für humane Erkrankungsfälle in Deutschland wurden bisher einige wenige Untersuchungen zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen *A. phagozytophilum* und zu Zeckeninfestationen mit *A. phagozytophilum* durchgeführt (Baumgarten et al. 2000, Fingerle et al. 1999, Hartelt et al. 2004, Hildebrandt et al. 2003, Baumgarten et al. 1999, von Loewenich et al. 2003).



### **1.3.1.3 Systematik und Morphologie**

Im Jahre 2001 erfolgte eine Revision der systematischen Gliederung der Ordnung der Rickettsiales auf Grundlage phylogenetischer Unterschiede. Seither gehört die Art *A. phagozytophilum* zur Gattung *Anaplasma* in die Familie der Anaplasmataceae. Dabei ist *A. phagozytophilum* ein Sammelbegriff für *Ehrlichia phagozytophila* (*E. phagozytophila*), *Ehrlichia equi* (*E. equi*) und das HGA-Agens (Dumler et al. 2001).

*A. phagozytophilum*- Bakterien sind kokkoid pleomorph, gram- negativ, 0,2 bis 1 µm klein und vermehren sich obligat intrazellulär in neutrophilen Granulozyten ihrer Wirtstiere beziehungsweise des Menschen. *A. phagozytophilum* besitzt eine für gram- negative Bakterien eigentümliche Form. Da ihm die Gene für die Synthese von Lipid A und Peptidoglykanen fehlen, sind sie nicht in seiner Zellwand enthalten und können ihre strukturgebende Eigenschaft nicht auf die Bakterienzellwand ausüben. Sie geben aber nicht nur Stabilität, sondern dienen auch der Erkennung durch das Immunsystem des Wirts. Dies erklärt, warum *A. phagozytophilum* nicht von allen Pathogenerkennungsmechanismen (wie zum Beispiel Toll like- Rezeptoren) im Wirt erkannt wird. Ebenfalls fehlen dem Bakterium die Gene zur Cholesterinsynthese und -modifikation. Daher ist es auf die Aufnahme aus der Wirtszelle angewiesen (Rikihisa 1991, Dumler et al. 2001 und 2005, Lin und Rikihisa 2003).

### **1.3.1.4 Wirtsspektrum und Vektoren von *Anaplasma phagozytophilum***

Als Vektor von *A. phagozytophilum* dient in den USA *Ixodes scapularis* (*I. scapularis*) und *Ixodes pacificus* (*I. pacificus*), in Asien *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) und in Europa *I. ricinus*. Zum Erregerreservoir gehören vor allem Wildtiere, wie Rehe und kleine Nagetiere (Alberdi et al. 2000, Liz et al. 2000). *A. phagozytophilum* kann dabei vom Vektor auf die Reservoiertiere als auch umgekehrt übertragen werden. Die Übertragung innerhalb der Zeckenpopulation erfolgt ausschließlich transstadial (Telford et al. 1996).

### **1.3.2 Lyme- Borreliose**

Die Lyme- Borreliose ist eine Multisystemerkrankung. Erste genauere Untersuchungen zu dieser Erkrankung wurden Mitte der 1970er Jahre in Lyme in Connecticut, USA gestartet, daher folgt der Name der Erkrankung. 1981 entdeckte der Arzt Dr. Burgdorfer zufällig spiralartige Bakterien in Zecken. Diese konnte er ein Jahr später in Reinkultur isolieren. Zu seinen Ehren wurde das die Lyme- Borreliose auslösende Bakterium *Borrelia burgdorferi* genannt (Horst 2003). Heute ist sie die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit (Brade und Hunfeld 2008).

### **1.3.2.1 Klinik, Diagnose und Therapie der Lyme- Borreliose**

Die Lyme- Borreliose wird wie die FSME von Zecken übertragen. Anders als FSMEV werden Borrelien jedoch nicht sofort nach dem Einstich, sondern erst nach einer Saugdauer von mindestens 16 bis 24 Stunden übertragen (Hayes und Piesman 2003). Nach einem Zeckenstich beträgt die Wahrscheinlichkeit einer Antikörperbildung abhängig vom jeweiligen Durchseuchungsgrad der Zeckenpopulation etwa 1,5- 6 %. Die meisten Fälle verlaufen dabei klinisch inapparent, nur 0,3- 1,4 % der Gestochenen erkranken manifest. Der Stich einer mit Borrelien infizierten Zecke führt abhängig von der Saugdauer der Zecke in etwa 20- 30 % zur Antikörperbildung (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008 b). Borrelien- spezifische Antikörper finden sich je nach Endemiegebiet und Altersgruppe in Deutschland bei 5- 50 % der Einwohner (Kaiser 2005).

Die Lyme- Borreliose wird in eine Frühmanifestation, Stadium I und II, und eine Spätmanifestation, Stadium III, unterteilt. Dabei durchläuft sie nur sehr selten alle drei Stadien (Nau et al. 2009, Robert Koch- Institut 2007 a, Christen und Eiffert 2003). In einer groß angelegten Studie in Bayern erkrankten 89 % der Patienten an einem Erythema migrans, 5 % an einer Stadium- II- Arthritis, 3 % an einer Neuroborreliose, 2 % an einem Lymphozytom oder erlitten eine kardiale Mitbeteiligung und weniger als 1 % erkrankten an einer Acrodermatitis chronica atrophicans (Huppertz 1999).

Das Stadium I stellt als häufigstes und oftmals einziges klinisches Symptom das Erythema migrans (Wanderröte) dar. Dabei bildet sich nach Tagen bis Wochen eine rötliche, kreisförmige, zentrifugal wachsende und zentral ablassende Verfärbung um die Einstichstelle herum. In der Regel ist sie selbstlimitierend. Besteht sie jedoch länger als vier Wochen, spricht man von einem Erythema chronicum migrans. In bis zu 30 % ist das Erythem mit allgemeinen Symptomen wie subfebrilen Temperaturen, Myalgien, Arthralgien und Kopfschmerz vergesellschaftet.

Nach Wochen bis Monaten stellt sich als Stadium II eine generalisierte Aussaat des Erregers ein. Dann können Gelenke, das zentrale Nervensystem (ZNS, Neuroborreliose) oder das Herz (Lyme- Karditis) mitbeteiligt sein. Die nach dem Erythem bei Erwachsenen am häufigsten beschriebene klinische Manifestation ist das Garin- Bujadoux- Bannwarth- Syndrom. Diese Meningoradikuloneuritis ist gekennzeichnet durch segmentale, brennende Nervenschmerzen. Häufig auftretende neurologische Ausfälle sind Paresen im Bereich der Hirnnerven wie die bilaterale Fazialisparese. Sie heilen meist folgenlos aus. Bei Kindern wird die frühe Neuroborreliose häufiger als isolierte Meningitis beobachtet. Als typische Hautbeteiligung in Stadium II gilt die Lymphadenosis cutis benigna Bäfverstedt, das Borrelien- Lymphozytom, das

bevorzugt an Ohrläppchen oder den Mamillen auftritt. Eine kardiale Mitbeteiligung ist in Europa selten zu beobachten.

Für das dritte Stadium sind eine Haut- und Gelenkbeteiligung typisch. Die frühestens nach einem halben Jahr auftretende Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer ist gekennzeichnet durch eine livide verfärbte Hautatrophie vor allem an den Akren und Extremitäten. Die Lyme-Arthritis als Gelenkbeteiligung stellt eine schubweise oder chronisch verlaufende mono- oder oligoartikuläre Arthritis meist der Kniegelenke dar. Als seltene Spätmanifestation gilt die durch chronische Myelitis, Meningoenzephalitis, Enzephalopathie, Vaskulopathie oder periphere Polyneuropathie imponierende chronische Neuroborreliose (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008 b, Kaiser 2005).

Eine typische klinische Symptomatik gibt den Hinweis auf eine Borrelieninfektion. Da das Krankheitsbild jedoch häufig von unspezifischen Symptomen geprägt ist, sollte ein Hinweis durch anschließende, stufenweise durchgeführte Serum- und Liquortests verifiziert werden. Die kulturelle Anzucht ist auf Grund der geringen Erregeranzahl in Geweben schwierig und deshalb nur in speziellen Labors möglich. Daher stellt der molekularbiologische ELISA- Test, ein Test auf das Vorhandensein von spezifisch gegen die Bakterien gebildeten Antikörpern, die erste Stufe dar. Dieser kann zwischen frühen IgM- und späten IgG- Antikörpern unterscheiden. Erst auf ein positives oder grenzwertiges Ergebnis sollte als zweite Stufe eine Bestätigung mittels weiteren molekularbiologischen Tests, eines Immunoblots, eingeholt werden. Grundsätzlich gilt, dass ein positives Testergebnis nur im Zusammenhang mit einer entsprechenden klinischen Symptomatik beweisend ist. Der Test auf Antikörper ist in der Hälfte aller Erytheme und in sehr frühen Stadien einer generalisierten Erkrankung im Serum negativ. Erst ein negatives Ergebnis nach acht Wochen schließt eine Borreliose aus.

Für die Therapie gilt: Je früher sie eingeleitet wird, desto erfolgreicher greift sie. Deshalb werden auch selbstlimitierende Stadien antibiotisch behandelt, sodass das Auftreten von Spätmanifestationen verhindert wird (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2008 b, Kaiser 2005).

### **1.3.2.2 Epidemiologie der Lyme-Borreliose und *Borrelia burgdorferi sensu lato***

Die Lyme- Borreliose kommt weltweit, wie in Abbildung 6 gezeigt, in Nordamerika, Asien, Australien und Europa vor.

Um einen Überblick über die endemische Situation in Europa zu geben, ist ein Vergleich zwischen den einzelnen Ländern nötig. Dieser stellt sich jedoch auf Grund unterschiedlicher Überwachungs- und Untersuchungsmethoden als schwierig heraus. Beispielsweise wurde in der Mitte der 1990er

Jahre in Südschweden eine mittlere Inzidenz von 69 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner gefunden, bei der besonders Kinder und ältere Erwachsene betroffen waren (Berglund et al. 1995). So werden in Europa derzeit geschätzt etwa 65.500 Erkrankungsfälle jährlich verzeichnet (Hubálek 2009).



**Abbildung 6: Vorkommen der Lyme- Borreliose weltweit (Gray 1998, Seite 251).**

In Deutschland ist die Borreliose flächendeckend verbreitet. Da die Meldepflicht auf Landesebene geregelt ist, besteht sie nicht bundesweit, sondern nur für die neuen Bundesländer Sachsen, Sachsen- Anhalt, Thüringen, Brandenburg und Mecklenburg- Vorpommern sowie für Berlin. Daher gibt es auch nur für den östlichen Teil Deutschlands flächendeckende epidemiologische Aufzeichnungen: Dort wurde eine steigende Inzidenz von 17,8 Erkrankungsfällen im Jahre 2002 auf 37,3 Erkrankungsfälle im Jahre 2006 auf 100.000 Einwohner verzeichnet. Dabei stammen fast drei Viertel aller Fälle aus Brandenburg und Sachsen. Insgesamt wurden 23.394 Erkrankungsfälle übermittelt (Robert Koch- Institut 2007 b).

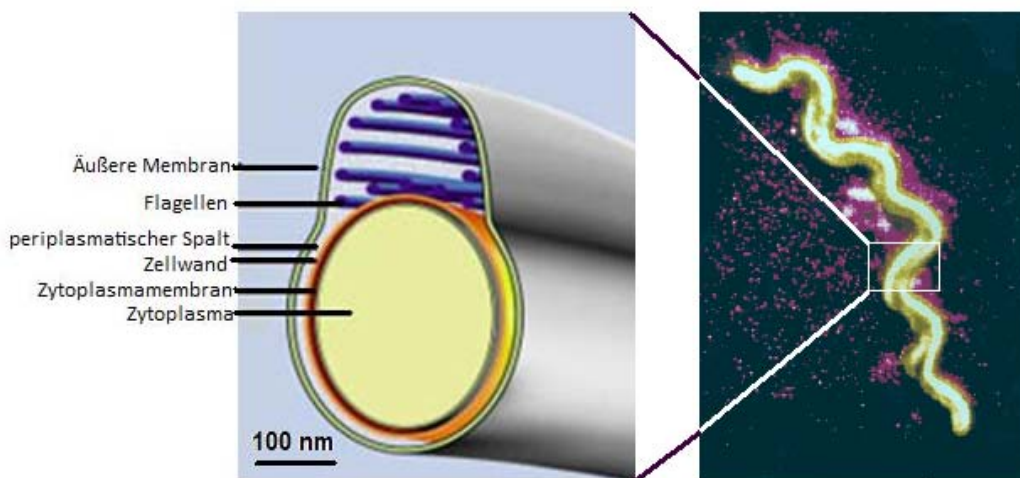
Um einen Anhalt auf die Wahrscheinlichkeit einer Infektion nach einem Zeckenstich zu bekommen, gibt es in einigen Regionen Europas und Deutschlands Untersuchungen zur Zeckeninfestation mit Borrelien. Tendenziell ist die Prävalenz von Borrelien durchseuchten Zecken von Nord nach Süd und West nach Ost zunehmend.

### **1.3.2.3 Systematik, Morphologie und Genom von *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

*B. burgdorferi* s. l. gehört in der Ordnung der Spirochaetales zu der Familie der Spirochaetaceae. Zu der Gattung *Borrelia* gehören als phylogenetische Hauptgruppen sowohl die Erreger des Rückfallfiebers als auch *B. burgdorferi* s. l.. Letztere besteht aus 14 Genospezies, die in sieben OspA- und 70 OspC- Serotypen näher eingeteilt werden können. Davon sind in Europa die folgenden humanpathogenen Borrelienspezies vertreten: *B. burgdorferi* sensu stricto (*B.*

*burgdorferi* s. s.), *Borrelia garinii* (*B. garinii*) und *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*). Weiterhin stehen *Borrelia bissettii* sp. nov. (*B. bissettii* sp. nov.) und *Borrelia spielmanii* (*B. spielmanii*) im Verdacht humanpathogen wirksam zu sein (Paster und Dewhirst 2000, Richter et al. 2006, Rudenko et al. 2009 a und 2009 b, Wang et al. 1999, Masuzawa et al. 2001, Postic et al. 2007).

*B. burgdorferi* s. l. sind gram negative bewegliche Spiralbakterien. Sie sind 10- 30 µm lang, maximal 0,5 µm im Durchmesser und helikal gewunden (siehe Abbildung 7). Das Genom der Borrelien besteht aus linearer bakterieller DNA und mindestens 17 linearen und zirkulären Plasmiden und beinhaltet unter anderem immunologisch wichtige Gene wie das Flagellin- Gen



**Abbildung 7: Darstellung von *B. burgdorferi* s. l. mittels Immunfluoreszenztest und als Querschnittszeichnung (modifiziert nach [http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/nrz\\_borrelien/lyme\\_erreger.htm](http://www.lgl.bayern.de/gesundheit/nrz_borrelien/lyme_erreger.htm) sowie <http://www.medizininfo.de/waldundwiese/borreliose/erreger.htm>, beides 09. 12. 2009).**

sowie Gene für die wichtigen Oberflächenproteine Osp A und Osp C (Skotarczak 2009). Die Flagellenbündel der Bakterien bestehen aus bis zu elf Flagellen und beinhalten Protoplasmazyylinder. Beide sind von einer äußeren Membran aus Lipoproteinen umgeben, den outer surface proteins (Osp) (Barbour und Hayes 1986, Brade und Hunfeld 2008). Die Lipoproteine der humanpathogenen Borrelien aktivieren das Immunsystem und können mittels monoklonaler Antikörper zur Differenzierung der Genospezies genutzt werden (Wilske et al. 1992). Dabei sind die Osp C und Osp A am besten untersucht, für letzteres sind mindestens acht Typen bekannt. Dabei korreliert die Genotypisierung auf Grund von Osp A am besten mit der derzeit gültigen Klassifizierung. Osp A- Typ 1 beziehungsweise Typ 2 wird *B. burgdorferi* s. s. beziehungsweise *B. afzelii* zugeordnet, *B. garinii* hingegen besteht aus den Serotypen drei bis acht (Wang et al. 1999, Wilske et al. 1993 und 1996). Die Untersuchungen von Osp A lassen eine Koppelung des Genotyps mit der Pathogenität und klinischer Ausprägung vermuten. Beispielsweise wird *B. burgdorferi* s. s. mit Arthritiden assoziiert. Weiterhin lassen unterschiedliche Prävalenzen der Typen in Zecken und

Patientenmaterial auf eine unterschiedliche Pathogenität und Infektiosität schlussfolgern (Wang et al. 1999).

## 1.4 Zielsetzung

FSME ist die häufigste Arbovirose in Deutschland. Die größten Inzidenzen werden in den südlichen Bundesländern beschrieben. Diese Gegenden werden als Risikogebiete bezeichnet. Hier kommen die FSME verursachenden FSMEV endemisch vor. Weder Niedersachsen noch speziell die Region Wingst sind als Risikogebiete verzeichnet. Dennoch wurden in den Jahren 2004 und 2007 dort zwei autochthone FSME- Erkrankungen diagnostiziert. Daher stellt sich die Frage, ob die Erreger in der norddeutschen Zeckenpopulation zirkulieren und weitere Mikroorganismen in Zecken nachweisbar sind. Diese Untersuchungen sollen im Rahmen einer epidemiologischen Studie des NLGA erfolgen. Damit soll ein mögliches Infektionsrisiko für die Bevölkerung und die Besucher der Wingst abgeschätzt werden, um ihm gegebenenfalls mit Vorsorgebestimmungen entgegenwirken zu können. Dazu sind folgende Schritte durchzuführen:

- I. Es sollen nach geographischer Kartierung der Wingst Zecken gesammelt werden.
- II. Die Zecken sollen mit Hilfe einer PCR auf das Vorhandensein von FSMEV untersucht werden.
- III. Durch den Nachweis spezifischer Antikörper in Seren der Bevölkerung der Wingst sollen zusätzlich Informationen über die Prävalenz der FSMEV gewonnen werden.
- IV. Neben den Untersuchungen auf FSMEV sollen mit Hilfe weiterer spezifischer PCR-Analysen *A. phagozytophilum* sowie *B. burgdorferi* s. l. identifiziert werden, um ebenfalls ein mögliches Infektionsrisiko abschätzen zu können.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

5 x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
10 x PCR Reaction Buffer	Roche Applied Science, Mannheim
Agarose	Roth, Karlsruhe
Aqua ad.	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H
Borsäure H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Chelex 100	BioRad, München
Demineralisiertes Wasser	NLGA – Hausanlage
DNA- Längenstandard, 100 Basenpaarleiter	Roche Applied Science, Mannheim
DTT (100 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol abs.	Roth, Karlsruhe
Ethanol (70%)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 %)	Roth, Karlsruhe
Gelladepuffer	Roth, Karlsruhe
Glycerin C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> (> 99,9 %)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
LC DNA Master SGI	Roche Applied Science, Mannheim
Light Cycler FastStart DNA Master HybProbe	Roche Applied Science, Mannheim
ME Agarose	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
MgCl <sub>2</sub>	Roche Applied Science, Mannheim
M- MLV RT Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Protector RNase Inhibitor 10000 Units	Roche Applied Science, Mannheim
Rotiphorese 10 x TBE- Puffer	Roth, Karlsruhe
Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Verdünnungspuffer	Virotech, Rüsselsheim
Waschlösung	Virotech, Rüsselsheim
Konjugat	Virotech, Rüsselsheim
TMB- Substratlösung	Virotech, Rüsselsheim
AVL- Puffer	Qiagen, Hilden
Carrier- RNA	Qiagen, Hilden
Elutionspuffer	Qiagen, Hilden
AW-1 Puffer	Qiagen, Hilden
AW-2 Puffer	Qiagen, Hilden

#### 2.1.2 Zusammensetzung der Lösungen und Puffer

AW- 1 Puffer	95 ml AW- Puffer 1 125 ml Ethanol abs.
AW- 2 Puffer	66 ml AW-2 Puffer 160 ml Ethanol abs.

Carrier- RNA (1 µg/µl)	Carrier- RNA 310 µl Elutionspuffer
Chelex 20 %	4 g Chelex 100 6 x mit 40 ml Aqua ad. waschen 20 ml Aqua ad.
DNA- Längenstandard	24 µl DNA Längenstandard XIV 26 µl Aqua ad. 10 µl Gel- Ladepuffer
Gel- Ladepuffer	0,01 g Bromphenolblau 5 ml Glycerin C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> 5 ml Ampuwa

### 2.1.3 Enzyme

Light Cycler FastStart Enzyme	Roche Applied Science, Mannheim
M-MLV Reverse Transcriptase 40000 Units	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Roche Applied Science, Mannheim
Taqstart antibody	Clon Tech, Californien, USA

### 2.1.4 Nukleotide und Nukleinsäuren

Alle verwendeten Nukleotide stammen, soweit nicht anders vermerkt, von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Die verwendeten Primer wurden von der Firma IBA, Göttingen und TIB Molbiol GmbH, Berlin hergestellt. Als Größenreferenz für DNA-Fragmente bei Elektrophoresen diente der in Abschnitt 2.2.1 beschriebene DNA- Längenstandard von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

Name der Primer	Sequenz	Sequenzlänge	Hersteller
EHR- For EHR- Rev	GGTACCYACAGAAGAAGTCC TAGCACTCATCGTTTACAGC	345 bp	TIB Molbiol GmbH, Berlin
FSM- 1 FSM- 2	GAGGCTGAACAACACTGCACGA GAACAGGCTCATTCTGATCT	357bp	IBA, Göttingen
FSM- 1i FSM- 2i	ACGGAACGTGACAAGGCTAG GCTTGTTACCATCTTTGGAG	252bp	IBA, Göttingen
nTM17.F nTM17.R	GTGGATCTATTGTATTAGATGAGG CTCTCG GCCAAAGTTCTGCAACATTAA CACCTAAAG	222bp	TIB Molbiol GmbH, Berlin
Random Primer (2,65 µg/µl)			Roche, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Interne Borrelienkontrolle			Qiagen, Hilden
Borrelienstandard			Qiagen, Hilden

**Tabelle 1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer, ihre Basenabfolgen, die Sequenzlänge ihrer Amplifikate und ihre Hersteller.**



Name der Sonden	Sequenz	Hersteller
Sonde EHR- Sens G F1	TACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCX	TiB Molbiol GmbH, Berlin
Sonde EHR- Anch Red 640	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA p	TiB Molbiol GmbH, Berlin

**Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Sonden, ihre Basenabfolge und ihre Hersteller.**

PCR Grade Nucleotide Mix	Roche Applied Science, Mannheim
--------------------------	---------------------------------

**Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Nukleotide und ihre Hersteller.**

### 2.1.5 Analyse-Systeme

Artus Borrelia LC PCR Kit	Qiagen, Hilden
FSME ELISA IgG/IgM Test	Virotech, Rüsselsheim
QIAmp DNA Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAmp Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
LC FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche Applied Science, Mannheim

### 2.1.6 Zellkultur

<i>Anaplasma phagozytophilum</i>	Dr. Hartelt, Landesgesundheitsamt Baden- Württemberg, Stuttgart
FSME-Viren vom Stamm Hochosterwitz auf BGH- Zellen	Prof. Heinz ,Medizinische Universität Wien, Wien

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Einmalpistille, steril	VWR International, Darmstadt
Light Cycler Kapillare (20 µl) und Stopper	Roche Applied Science, Mannheim
Mikroschraubröhrchen (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Multi Tap- Top Tubes (1,5 ml)	Roth, Karlsruhe
Multi Ultra Stripes	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney, Düsseldorf
Pipettenspitzen Multi Guard Tips mit Aerosolfilter	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (200 µl)	Roth, Karlsruhe
Safe- Lock Tubes (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterile Röhrchen (50 ml)	Greiner Bio- One GmbH, Frickenhausen
QIAquick Spin Säulen + Auffanggefäße	Qiagen, Hilden

### 2.1.8 Geräte und Hilfsmittel

Blockcycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Blockschälchen	VWR International, Darmstadt
Brutschrank	Memmert, Schwabach
Einkanalpipetten, variabel	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer HE33	Pharmacia, Schweden

Gefrierschrank  
Gel- Kammer inkl. Träger und Kämmen  
Image- Quant- 300- Photodokumentationsanlage  
Kühlblock  
Light Cyler 1.5  
Mehrkanalpipetten, variabel  
Messzylinder 50/100 ml  
Mikrowelle  
Mikrozentrifuge  
Minispin- Zentrifuge  
Mörser, elektrisch  
Photometer

Pinzetten  
PowerSupply EPS 301  
Reagenzglasschüttler/Vortex  
Reagenzständer  
Spatel  
Thermocycler Personal Cyler/T3  
Thermomixer comfort  
Waage  
Werkbank LaminAir  
Zentrifuge

Liebherr, Ochsenhausen  
GE Healthcare, München  
GE-Healthcare Amersham  
Roche Applied Science, Mannheim  
Roche Applied Science, Mannheim  
Eppendorf, Hamburg  
Labor Brandt, Gießen  
Panasonic, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Biozym, Hessisch Oldendorf  
VWR International, Darmstadt  
Anthos Rosys 2001,  
Heerhugowaard, Niederlande  
VWR International, Darmstadt  
GE Healthcare, München  
Merck, Darmstadt  
VWR International, Darmstadt  
VWR International, Darmstadt  
Biometra, Göttingen  
Eppendorf, Hamburg  
Sartorius, Göttingen  
Heraeus, Hanau  
Eppendorf, Hamburg

### 2.1.9 Software

Blastn

Light Cyler Software, Version 3.5  
Microsoft Excel 2007  
ViroCal, Version 3.0  
R, Version 2.10.1

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>,  
21. Dezember 2009  
Roche Applied Science, Mannheim  
Microsoft Corporation Int.  
Virotech, Rüsselsheim  
[www.r-project.org](http://www.r-project.org), 14. Januar  
2010

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Sammlung der Zecken in der Region Wingst

Von Mai bis Juni 2008 sowie im Juni 2009 wurden 4171 Zecken in der Gemeinde Wingst gesammelt. Sie gehört dem niedersächsischen Landkreis Cuxhaven an und liegt nur wenige Meter über dem Niveau des Meeresspiegels. Mit 64 Einwohnern pro Quadratkilometer (km<sup>2</sup>) ist das 55 km<sup>2</sup> umfassende Naherholungsgebiet dünn besiedelt. Es ist ein mit Mischwäldern bedeckter, kleiner Geestrücken, der von Marsch- und Moorlandschaft umgeben und in Abbildung 8 dargestellt ist.

Nach genauer schachbrettmusterartiger Kartierung des Gebiets wurden 3.392 Zecken- Nymphen, 339 weibliche adulte Zecken und 440 männliche adulte Zecken mit der Flaggenmethode an 15 verschiedenen Fangorten gesammelt. Bei der Flaggenmethode wird ein weißes Baumwolltuch an einem stabförmigen Holz befestigt und zur Sammlung von ungesogenen Zecken über die Vegetation gestrichen. Um maximale Fangzahlen aller Entwicklungsstadien von *I. ricinus* zu erreichen, wurde in verschiedenen Höhen der Vegetation gesammelt. Die abgestreiften Zecken wurden in 70 %igem Ethanol zwischengelagert. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Zecken anhand des Differenzierungsschlüssels von Hillyard aus dem Jahre 1996. Weiterhin wurden die Nymphen und männlichen Adulten, die für die Untersuchung auf FSMEV vorgesehen waren, in Pools bestehend aus zehn Zecken, die weiblichen Adulten für ebensolche Untersuchung in Pools bestehend aus fünf Zecken in 1,5- ml- Mikroschraubröhrchen bei – 70 °C eingefroren. Für die Untersuchung auf *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* wurden Zecken aller Entwicklungsstadien separat ebenfalls bei – 70 °C tiefgefroren.



Abbildung 8: Übersicht über die untersuchte Gemeinde Wingst, Aufnahme eines beispielhaften Sammelortes (nach <http://www.moskau.diplo.de/Vertretung/moskau/de/Startseite.html>, 19. 02. 2009 sowie Auszug aus I&W Plan, Piechottka: Landkarte der Gemeinde Wingst, Maßstab 1:20.000).

## 2.2.2 Extraktion von Nukleinsäure aus Zecken

Für die Untersuchung der Durchseuchung der *I. ricinus*- Population mit FSMEV sowie *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. wurde der Direktnachweis von Nukleinsäure mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (siehe Abschnitt 2.2.3) gewählt. Zur Vorbereitung hierauf musste die Nukleinsäure extrahiert und gereinigt werden.

### 2.2.2.1 RNA- Extraktion

Die gesamte RNA- Extraktion zur Untersuchung auf FSMEV wurde mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Zu Beginn wurden 560 µl des AVL- Puffers und 5,6 µl der Carrier-RNA pro Zecken- Pool vorgelegt. Der im Kit enthaltene AVL- Puffer dient der Lyse von Zellwandbestandteilen sowie der Inaktivierung von RNasen und sichert somit die Aufreinigung von intakter Nukleinsäure. Die ebenfalls enthaltene Carrier- RNA ermöglicht eine verbesserte Adsorption der gegebenenfalls vorhandenen FSMEV- RNA an einen Filter, sodass auch kleinste Mengen an Nukleinsäure detektiert werden können. Nach dem Auftauen der Zeckenpools und Überführung in frische, autoklavierte 1,5- ml- Mikroschraubröhrchen ermöglichte die Zugabe von jeweils 60 µl des AVL- Puffer/Carrier- RNA- Gemisches das unkomplizierte Homogenisieren mittels eines sterilen Pistills. Nach Zugabe des verbleibenden AVL- Puffer/Carrier- RNA- Gemisches und Mischen des Reaktionsansatzes mit einer anschließenden zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 560 µl Ethanol absoluta (Ethanol abs.) zur Ausfällung von Nukleinsäuren. Nach Abzentrifugation der zermahlenden Zeckenüberreste für zwei Minuten mit 13.200 rounds per minute (rpm) konnte der Überstand des Reaktionsansatzes in zwei Schritten in eine Spinsäule pipettiert und jeweils für eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert werden. Die Spinsäule enthält einen Filter, der die eventuell vorhandene Nukleinsäure adsorbiert. Nach der Zentrifugation war die Nukleinsäure gegebenenfalls an den Filter gebunden, sodass der Durchlauf anschließend verworfen werden konnte. Um die Reinheit der zu eluierenden RNA zu steigern und eine Kontamination mit PCR- hemmenden Substanzen wie Proteinen zu verhindern, wurde der Filter zweifach mit 500 µl der Puffer AW- 1 und AW- 2 gewaschen und für jeweils eine Minute bei 8000 rpm beziehungsweise für drei Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Nach Umsetzen der Säule auf ein frisches, 1,5 ml fassendes Nuklease-freies Multi- Tab- Top- Tube folgte als letzter Schritt der Aufreinigung die Eluierung der Nukleinsäure. Die Zugabe von 60 µl Elutionspuffer auf die Membran mit anschließender Zentrifugation bei 8.000 rpm löste die Nukleinsäure vom Filter. Die reine RNA lag gegebenenfalls nun fertig zur Weiterverarbeitung im Eluat vor und wurde sofort in die PCR eingesetzt oder bei – 70 °C gelagert.

Bei jeder Aufarbeitung wurden eine positive und eine negative Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen des Reaktionsansatzes mitgeführt. Als positive Kontrolle dienten FSMEV vom Stamm Hochosterwitz. Es wurden 140 µl der 1:1.000 verdünnten FSMEV- Zellkultur unter S3- Laborbedingungen zu 560 µl des AVL- Puffer/Carrier- RNA -Gemisches pipettiert und anschließend gemeinsam mit den Proben aufgearbeitet. Als negative Kontrolle dienten 140 µl Aqua ad injectabilia (Aqua ad.) im Reaktionsansatz.

### 2.2.2.2 DNA- Extraktion

Die gesamte DNA- Extraktion zur Untersuchung auf *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* wurde mit 20 %iger Chelex- 100- Suspension von Bio Rad durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Ionen- Austausch- Chromatographie. Chelex 100 besteht aus chemisch inerten Kunstharzpartikeln, die als Träger für Chelatoren dienen und unter anderem bivalente Kalzium- oder Magnesium- Ionen elektrostatisch binden können. Durch die Chelatisierung der Ionen werden DNasen inaktiviert, Stabilität gebende Zellbestandteile destabilisiert und PCR- Inhibitoren eliminiert. Aufbauend auf der Publikation von Walsh et al. (1991) wurde das Extraktionsprotokoll für DNA aus Zecken von Glenn, Laboratory of Molecular Systematics Washington DC/USA erstellt. Zur Herstellung der 20 %igen Chelex- Suspension wurden 4 g Chelex 100 mit 40 ml Aqua ad. gewaschen und 10 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde sechs Mal wiederholt, um die Matrix anschließend in 20 ml Aqua ad. aufzunehmen.

Zu Beginn der DNA- Aufarbeitung wurden die aufgetauten Zecken in frische 1,5- ml- Mikroschraubröhrchen umgesetzt und 50 µl der 20 %igen Chelex- Suspension sowie 5 µl der internen Borrelienkontrolle je Reaktionsansatz hinzupipettiert. Die Zugabe der internen Borrelienkontrolle ermöglicht sowohl eine Kontrolle des korrekten Ablaufs der DNA- Aufreinigung als auch den späteren Ausschluss PCR- inhibierender Bestandteile. Anschließend wurden die Zecken in den Reaktionsansätzen mit einem sterilen Pistill homogenisiert und gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Sekunden auf 4 °C abgekühlt, für 30 Sekunden bei 13.200 rpm zentrifugiert und für 30 Minuten bei 58 °C inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum eine Abkühlung auf 4 °C, eine Zentrifugation und Erhitzung der Reaktionsansätze für 10 Minuten auf 98 °C. Durch das Erhitzen wird die Zellmembran vollständig denaturiert. Nach einer weiteren Mischung und einer nochmaligen Zentrifugation für 3 Minuten bei 13.200 rpm lag die DNA gegebenenfalls im Überstand vor. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und anschließend mittels PCR analysiert.

Zur Kontrolle der Aufarbeitung und zum Ausschluss von Kontaminationen wurden in jeder DNA- Aufarbeitung jeweils eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Ihre Aufarbeitung erfolgte gemeinsam mit den Proben. Als positive und negative Kontrolle wurden 10 µl des positiven Borrelienstandards mit einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  Kopien/µl (cop/µl) aus dem Artus Borrelia LC PCR Kit beziehungsweise 10 µl Aqua ad. verwendet.

### **2.2.3 Polymerase- Kettenreaktion mit Nachweis der Amplifikate**

Die PCR ist eine Methode, die es ermöglicht, spezifische DNA- Abschnitte zu vervielfachen, das heißt zu amplifizieren. Diese in- vitro- Technik beruht auf thermozyklischen Reaktionen, bei der schon eine sehr geringe Menge an Nukleinsäure ausreicht, um exponentiell vermehrt zu werden. Zu Beginn des Versuchs wurde entsprechend der Probenanzahl der Mastermix unter der Sterilbank in einem separaten Raum angesetzt und in die Reaktionsgefäße pipettiert. Der Mastermix beinhaltet eine thermostabile DNA-Polymerase, Primer, Nukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP),  $Mg^{2+}$  und Puffer. Nach Zugabe der Nukleinsäure konnte die Amplifikationsreaktion in einem Thermocycler gestartet werden. Ein Zyklus der PCR umfasst drei Reaktionsschritte: Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C zu Einzelsträngen denaturiert. Im Anschluss erfolgt durch Abkühlung das Primer- Annealing. Primer sind kurze einzelsträngige DNA- Moleküle, die sich als Startermoleküle der DNA- Synthese an den komplementären Matrizenstrang binden. Der dritte Schritt, die Elongation, beinhaltet einen Temperaturanstieg auf 70 bis 80 °C. Diese Temperatur stellt optimale Bedingungen für die DNA- Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* stammt. Sie denaturiert auch bei den angewendeten hohen Temperaturen nicht und ermöglicht in Anwesenheit von einzelnen Nukleotiden die komplementäre Ergänzung des Matrizenstranges zu einem Doppelstrang in 5' zu 3' Richtung. Heute bestehen verschiedene Methoden, zu denen auch die nested PCR und die real- time PCR zählen.

#### **2.2.3.1 Amplifikation von DNA mittels nested PCR**

Die nested PCR nutzt zur Verbesserung der Spezifität zwei weitere „innere“ Primer. In einer ersten Phase verläuft die PCR wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben. In der zweiten Phase wird das entstandene Primäramplifikat mittels „innerer“ Primer, deren Bindungsstellen innerhalb des ersten Amplifikats liegen, wiederum als Matrize genutzt. Durch die „inneren“ Primer steigt die Sensitivität der nested PCR, da in der ersten Phase unspezifisch gebildete Amplifikate in der zweiten Runde nicht erkannt und somit nicht amplifiziert werden. Das in der zweiten Phase gebildete Amplifikat kann im Anschluss mittels Gelelektrophorese wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben detektiert werden.

Zur Durchführung einer nested PCR können Thermocycler genutzt werden. Hierzu werden der Mastermix und die Probe in Reaktionsröhrchen pipettiert und verschlossen. Nach Beendigung der ersten Phase werden die entstandenen Primäramplifikate in einem separaten Raum in unbenutzte Reaktionsröhrchen, in denen der Mastermix für die zweite Runde bereits vorgelegt ist, umgesetzt. Nun kann die zweite Phase beginnen.

### **2.2.3.2 Gelelektrophorese und Detektion der nested PCR-Amplifikate**

Der Nachweis der mittels nested PCR entstandenen PCR- Amplifikate wurde mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung des Elektrophorese- Gels wurden 0,3 g Agarose in 20 ml 1x TBE-Puffer gekocht und in das noch flüssige Agarosegel 1 µl Ethidiumbromid gegeben. Das Gel-Ethidiumbromid-Gemisch wurde auf einen Gelträger gegossen und ein Gelkamm zur Ausformung von Geltaschen eingesteckt. Nach Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 x TBE-Puffer gefüllt. Anschließend wurden jeweils 10 µl der PCR- Amplifikate zusammen mit 2 µl Gel- Ladepuffer vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Der Ladepuffer ermöglicht zum einen durch Dichteerhöhung des PCR- Amplifikats das Absinken der Probe in die Geltaschen und zum anderen färbt er das Amplifikat blau und macht somit die Probe beim Pipettieren sichtbar. Anschließend wurde an das Gel eine Gleichspannung (8-12 V/cm Gellänge) angelegt. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie unter der Spannung in dem Gel in Richtung der Anode. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit und somit die Laufstrecke umgekehrt proportional zu der Größe des Amplifikats. Der zuvor zugegebene Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basenpaaren (bp) der DNA und verändert so ihr Absorptionsspektrum. Unter UV- Licht mit einer Wellenlänge von 595 nm können DNA-Amplifikate sichtbar gemacht werden. Zum Größenabgleich der Amplifikate wurden Längenstandards parallel zu den Amplifikaten auf das Gel aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte fotografisch mittels des Image Quant 300 und wurde zusätzlich als Datei auf dem Computer gespeichert.

### **2.2.3.3 Amplifikation von DNA mittels real- time PCR und anschließender Detektion durch Fluoreszenzfarbstoff und Schmelzkurvenanalyse**

Die real- time PCR ermöglicht die Detektion der Amplifikate noch während des Reaktionsablaufes. Die Amplifikation der Nukleinsäuren erfolgt wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Nach jedem Zyklus erfolgt die Detektion mittels Farbstoffen wie SYBR Green I. Da der Farbstoff SYBR Green I in die doppelsträngige DNA interkaliert, wird sein Fluoreszenzsignal am Ende der Elongationsphase, in der die gesamte Nukleinsäure doppelsträngig vorliegt, bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen. Die Stärke des Signals korreliert mit dem Umfang an gebildeten Amplifikaten. SYBR Green I reagiert allerdings nicht sequenzspezifisch. Zur Überprüfung der Spezifität der PCR kann im Anschluss an den letzten Zyklus eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Durch langsames Erhitzen denaturiert die doppelsträngige DNA bei ihrem spezifischen Schmelzpunkt, an dem das durch SYBR Green I entstandene Fluoreszenzsignal rapide abfällt. Durch die negative erste Ableitung der Kurve der Fluoreszenzsignalstärke, aufgetragen gegen die Wellenlänge, wird die spezifische Schmelztemperatur als Peak dargestellt. So wird eine Unterscheidung zwischen spezifisch und unspezifisch gebildeten Amplifikaten möglich.

Unter Nutzung von Taq- Man- Sonden entfällt eine Schmelzkurvenanalyse, da diese Sonden sequenzspezifisch detektieren. Sie sind in ihrer Basenabfolge komplementär zu einer Basensequenz innerhalb der Amplifikate und haben an ihrem 5'- Ende einen Reporter- und an ihrem 3'- Ende einen Quencher- Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Solange beide Farbstoffe an die Sonde gebunden sind, löscht der Quencher das Signal des Reporter-moleküls. Die Exonuklease-Eigenschaften der DNA- Polymerase ermöglichen einen Abbau der Sonde mit inbegriffener Trennung der Farbstoffe. Die Signalauslöschung wird aufgehoben, das Fluoreszenzsignal steigt mit jedem Zyklus proportional zu der Anzahl an neugebildeten Amplifikaten an (Thiemann 2002, Mülhardt 2009).

Eine real- time PCR kann mittels eines Light Cyclers durchgeführt werden. Hierzu werden der Mastermix inklusive der Sonden und die Proben in 20 µL fassende Kapillargefäße pipettiert. Die verschlossenen Gefäße werden in einem Rondell in einen Light Cyler eingesetzt und verbleiben dort durchgängig bis zum Durchlaufen des letzten Temperaturzyklus. Die gemessenen Fluoreszenzsignale werden digital an einen Computer weitergeleitet. Der Computer trägt die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals gegen die Anzahl an bisher durchlaufenen Temperaturzyklen als eine Kurve auf, die noch während der Untersuchung am Bildschirm abgelesen werden kann. Da die Menge an Ausgangsnukleinsäure exponentiell vermehrt wird, resultiert eine hohe Konzentration an Ausgangsmaterial in einem Fluoreszenzsignal großer Stärke und damit einer steil ansteigenden Kurve; die Zeckenprobe kann positiv gewertet werden. Ein flacher Kurvenverlauf entsteht durch fehlende Nukleinsäure in der Probe, sodass diese negativ bewertet wird.

#### **2.2.4 Sequenzanalyse**

Durch die Sequenzierung wird Kenntnis über die Basenabfolge von Nukleinsäure erlangt. Um eine Sequenzierung zu ermöglichen, müssen die verwendeten Amplifikate aus der PCR zunächst von Restnukleotiden, Puffer und Polymeraseenzym gereinigt werden. Dies wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen nach den Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn wurden QIAquick- Spin- Säulen entsprechend der Probenanzahl in 2- ml- Auffanggefäße gesetzt. Die gegebenenfalls Nukleinsäure enthaltenden PCR- Amplifikate wurden mit dem PB- Puffer aus dem Kit in einem Verhältnis von 1:5 gemischt. Der Puffer ermöglicht die effiziente Bindung von doppel- und einzelsträngiger DNA mit einer minimalen Größe von 100 bp an eine als Filter fungierende, in der Säule enthaltene Quarzmembran. Die Nukleinsäure/PB-Puffer- Mischungen wurden jeweils in eine Säule gegeben und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und anschließend wurden auf jede Säule 750 µl des PE- Puffers pipettiert. Dieser



ethanolhaltige Puffer entfernt alle unerwünschten Salze aus dem Reaktionsansatz. Durch mehrfaches Zentrifugieren für eine Minute bei 13000 rpm und Verwerfen des Durchlaufs wurde der Ethanol aus dem Reaktionsansatz wieder entfernt. Die Säulen wurden in frische, autoklavierte 1,5 ml fassende Multi- Tap- Top- Tubes umgesetzt, mit 30 µl des Elutionspuffers versetzt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das PCR- Amplifikat durch Zentrifugation für eine Minute bei 13000 rpm eluiert. Für die Sequenzierung wurden 6 µl des gereinigten Amplifikats zusammen mit 1 µl des Vorwärts- Primers in ein 200- µl- Eppendorf- Rörchen pipettiert.

Die anschließende Sequenzierung erfolgte im Göttinger Labor SeqLab nach der Methode von Sanger. Die Sanger-Methode erfolgt nach dem Kettenabbruch- Mechanismus mittels Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP). Die ddNTP sind entsprechend ihrer Basen an jeweils einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Durch das Fehlen einer Hydroxylgruppe führt der Einbau der ddNTP durch eine DNA- Polymerase zu einem Kettenabbruch. Über eine Kapillarelektrophorese erfolgt eine Auftrennung der Kettenabbruchfragmente. Diese werden durch einen Laser zur Emission angeregt und die Basenabfolge wird computergestützt aufgezeichnet (Müller- Esterl 2004).

### **2.2.5 Statistik**

Alle Analysen der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Microsoft Excel 2007“, der freien Software „R“, Version 2.10.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), 14. Januar 2010) und der statistischen Stelle der Universität Göttingen vorgenommen. Die Prävalenz von viren- beziehungsweise bakteriendurchseuchten Zecken wurde zum einen prozentual, zum anderen als 95%- Konfidenzintervall (Pearson-Clopper-Intervalle) angegeben. Unterschiede in den prozentualen Ergebnissen wurden bei *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. zwischen Nymphen- Zecken, männlichen und weiblichen adulten Zecken jeweils mit Fishers exaktem Test untersucht. Für den Vergleich der Fragebogenergebnisse mit den Laborbefunden wurde ebenfalls Fishers exakter Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit 5% festgelegt.

### **2.2.6 Methoden zur Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren**

Die Untersuchung der Zeckenpopulation der Wingst auf eine Durchseuchung mit FSMEV erfolgte mittels PCR. Diese ermöglichte einen direkten Nachweis von FSME- RNA mittels PCR durch deren Amplifikation, gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Detektion.

### 2.2.6.1 PCR zum Nachweis der Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- RNA

Zum Nachweis von FSMEV- RNA wurde ein Bereich des stark konservierten viralen NS5- Gens mittels einer nested PCR (siehe Abschnitt 2.2.3.1) amplifiziert. Um die Amplifikation der RNA zu ermöglichen, muss sie zuvor in eine copyDNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die Umschreibung von RNA in cDNA ist mit Hilfe der reversen Transkriptase, einer RNA abhängigen DNA- Polymerase, möglich.

Die Aufreinigung der RNA wurde wie in 2.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Die anschließende cDNA- Synthese mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit erfolgte laut Herstellerangaben: Zu Beginn wurden die Reagenzien des Mastermixes gekühlt und wie in Tabelle 4 beschrieben in einem separaten Raum entsprechend der Probenanzahl in Safe- Lock Tubes vorgelegt. Als Primer für die reverse Transkription wurden Random Primer verwendet. Diese Primer sind Hexanukleotide mit zufälliger Basensequenz, sodass das Umschreiben RNA jeglicher Sequenz in cDNA möglich wird. Nach Zugabe von gereinigter FSMEV- RNA wurde die reverse Transkription im Thermocycler unter den in Tabelle 5 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

Reagenz	Volumen [µl] für einen Reaktionsansatz
5x 1st Strand Buffer	4,00
Aqua ad.	2,15
PCR Grade Nucleotide Mix	1,00
Random Primer	0,50
DTT	2,00
Protector RNase- Inhibitor	0,25
M-MLV Reverse Transcriptase	0,10
RNA	10,00
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,00</b>

Tabelle 4: Reaktionsansatz laut Herstellerangaben mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit zur Synthese von cDNA aus FSMEV- RNA mittels reverser Transkriptase.

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Reverse Transkription	40	60
Denaturierung	95	2

Tabelle 5: Temperaturprotokoll laut Herstellerangaben mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit zur Synthese von cDNA aus FSMEV- RNA mittels reverser Transkriptase.

Im Anschluss an die reverse Transkription wurde die in Abschnitt 2.2.3 beschriebene nested PCR leicht modifiziert nach Puchhammer- Stöckl et al. (1995) verwendet. Zu Beginn des ersten Schrittes der PCR wurde der Mastermix, wie in Tabelle 6 beschrieben, in einem separaten Raum, gekühlt in Multi Ultra Stripes vorgelegt. Für den ersten Schritt der PCR wurde das Primerpaar

FSM- 1/FSM- 2 (siehe Tabelle 7) genutzt und damit ein 357 bp langer Nukleinsäurebereich amplifiziert. Nach Zugabe der zuvor hergestellten cDNA wurde die Amplifikation im Thermocycler unter den in Tabelle 8 beschriebenen Bedingungen gestartet.

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l] für einen Reaktionsansatz
Aqua ad.	36,75
10 x Reaction Buffer	5
FSM- 1	1
FSM- 2	1
PCR Grade Nucleotide Mix	1
Taq DNA Polymerase	0,25
cDNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50</b>

**Tabelle 6: Reaktionsansatz für den ersten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV (nach Puchhammer- Stöckl et al. 1995, Seite 323).**

Primer	Sequenz (5´-3´)
FSM- 1	GAGGCTGAACAACACTGCACGA
FSM- 2	GAACACGTCCATTCTGATCT
FSM- 1i	ACGGAACGTGACAAGGCTAG
FSM- 2i	GCTTGTTACCATCTTTGGAG

**Tabelle 7: Primer für den Nachweis von FSMEV, die Zielsequenz liegt innerhalb des NS5- Gens (Puchhammer- Stöckl et al. 1995, Seite 323).**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Polymerase	94	120	1
Denaturierung	94	30	} 25
Annealing	40	30	
Elongation	68	30	
	72	180	1

**Tabelle 8: Temperatur- Protokoll für den ersten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV (nach Puchhammer- Stöckl et al. 1995, Seite 323).**

Für den zweiten Schritt der nested PCR wurde das Primerpaar FSM- 1i/FSM-2i (siehe Tabelle 7) genutzt, mit dessen Hilfe ein 252 bp langer Abschnitt, der innerhalb des ersten Produkts liegt, amplifiziert wird. Zu Beginn wurde der Mastermix, wie in Tabelle 9 beschrieben, gekühlt in ein Safe- Lock Tube pipettiert. Zu diesem Ansatz wurden 2  $\mu$ l Erstrundenamplifikat pipettiert und die PCR nach dem Temperaturprotokoll aus Tabelle 10 gestartet. Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten beide Pipettierschritte wie schon bei der ersten PCR-Runde in separaten Räumen.

In jeder PCR wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Als positive Kontrolle diente FSMEV- RNA extrahiert aus einer Zellkultur (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Als negative Kontrolle dient im Reaktionsansatz Aqua ad..

Reagenz	Volumen [µl] für einen Reaktionsansatz
Aqua ad.	40,75
10 x Reaction Buffer	5
FSM- 1i	1
FSM- 2i	1
PCR Grade Nucleotide Mix	1
Taq DNA Polymerase	0,25
Erstrundenamplifikat	2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>51</b>

**Tabelle 9: Reaktionsansatz für den zweiten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV- RNA (nach Puchhammer- Stöckl et al. 1995, Seite 323).**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Polymerase	94	120	1
Denaturierung	94	30	} 30s
Annealing	50	30	
Elongation	72	30	
	72	180	1

**Tabelle 10: Temperaturprotokoll für den zweiten Schritt der nested PCR zum Nachweis von FSMEV (nach Puchhammer- Stöckl et al. 1995, Seite 323).**

### 2.2.6.2 Detektion amplifizierter Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Nukleinsäure

Die aus der nested PCR entstandenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.2.3.2) aufgetrennt und detektiert. Hierzu wurden 10 µl Amplifikat mit 2 µl Gel-Ladepuffer versetzt und in jeweils eine Geltasche eines 1,5 %igen Agarosegels pipettiert. Zum Größenabgleich der Amplifikate wurde ein DNA- Längenstandard mit 100 Basenpaarleitern parallel zu den Amplifikaten auf das Gel aufgetragen. Wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben wurde der Elektrophoreselauf gestartet und die Nukleinsäureamplifikate nach 20 Minuten mittels UV-Licht detektiert.

### 2.2.6.3 Sequenzanalyse möglicher Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Amplifikate

Zur Bestätigung des PCR- Ergebnisses wurde im Anschluss eine Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate durchgeführt. Die Vorbereitung und Sequenzanalyse der Amplifikate erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 dargestellt. Die gelieferten Rohdaten wurden computergestützt mit einer speziellen Herstellersoftware in die Basensequenz umgewandelt und im Internet unter

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> mit Hilfe des Programms Blastn mit bereits bekannten Sequenzen abgeglichen.

### **2.2.7 Enzymimmunoassay zur Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren**

Als weiterer Marker für das Vorkommen von in Naturherden zirkulierenden FSMEV wurde die Prävalenz von Antikörpern gegen FSMEV gewählt. Hierzu sollten Blutproben von Bewohnern der Wingst auf FSMEV- spezifische IgG- Antikörper untersucht werden. Zur korrekten Bewertung der Laborergebnisse wurde ein Fragebogen entwickelt und von den teilnehmenden Bewohnern ausgefüllt. Zwei der Hausärzte der Wingst erklärten sich zur Mithilfe an der Studie bereit. Die für die Blutabnahme benötigten Materialien wie Monovetten, Sicherheitskanülen, Einsendescheine mit integrierter Einwilligungserklärung und Begleitfragebogen sowie Informationsmaterialien wurden von dem Niedersächsischen Landesgesundheitsamt in Hannover gestellt. Im Rahmen des Datenschutzes wurde der Ethikantrag, der schon für die Erfassung von Antikörpern gegen FSMEV bei Niedersächsischen Forstbediensteten bei der Niedersächsischen Landesärztekammer gestellt und bewilligt war, um die Erfassung der Bewohner der Wingst erweitert. Dieser lautete "Seroprävalenzstudie zu Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und Echinokokkose (Fuchsbandwurmerkrankung) bei den Beschäftigten der Niedersächsischen Landesforsten beziehungsweise den niedersächsischen Mitarbeitern der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt (NW-FVA)", Geschäftszeichen Bo/11/2006.

#### **2.2.7.1 Enzymimmunoassay**

Die von den Hausärzten eingesandten Blutproben wurden mit Hilfe des FSME ELISA IgG/IgM Testkit von Virotech auf das Vorhandensein von Antikörpern per ELISA untersucht. Hierzu erfolgte eine Verdünnung von je 10 µl des Serums mit 1000 µl Verdünnungspuffer aus dem Testkit. Dieses Proben/Verdünnungspuffer- Gemisch wurde mit weiteren 100 µl des Verdünnungspuffers in einzelne Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich wurden eine positive Kontrolle, zwei Grenzwertkontrollen, eine negative Probe und ein Leerwert auf der Mikrotiterplatte mitgeführt. Die positive und negative Kontrolle dienten als Nachweis der korrekt abgelaufenen Versuchsdurchführung. Anschließend erfolgte eine 30- minütige Inkubationszeit bei 37 °C. Nach viermaligem Waschen der Kavitäten mit je 400 µl Waschlösung wurde die Platte einmal trocken geklopft und je 100 µl des gebrauchsfertigen Konjugats in die Vertiefungen pipettiert. Der Ansatz wurde wiederum 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend erneut gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl der TMB- Substratlösung in jede Kavität wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach erneuter 30- minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Reaktion

durch Zugabe von je 50 µl Zitrat- Stopplösung und vorsichtiges Mischen beendet. Anschließend wurde die Extinktion der gelb gefärbten Probenansätze photometrisch bei 450 nm und 620 nm im Mikrotiterplatten- Photometer gemessen. Die photometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ViroCal, das aus den Extinktionswerten Virotech- Einheiten (VE) errechnete. Der Extinktionswert des Leerwertes musste von allen Extinktionen abgezogen werden. Die VE des Patientenserums errechnen sich wie folgt:

$$\text{VE- Einheiten}_{\text{Patient}} = 10 \times (\text{Extinktionswert}_{\text{Patientenserum}} / \text{Extinktionswert}_{\text{Grenzwert- Kontrolle}})$$

VE, die kleiner als 9,0 beziehungsweise größer als 11,0 sind, wurden als definitiv negativ beziehungsweise positiv gewertet. VE zwischen 9,0 und 11,0 wurden als nicht signifikant erhöhte Antikörper- Konzentrationen gewertet und somit grenzwertig beurteilt.

Die Untersuchung auf Antikörper gegen FSMEV mittels ELISA kann beispielsweise durch Gelbfieberimpfungen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Daher wurde bei einem Antikörpernachweis die Probe an ein Referenzlabor in Wien geschickt. Dort wurde ein Neutralisationstest zur Bestätigung durchgeführt.

#### **2.2.7.2 Patientenfragebogen**

Um mit den Probanden gegebenenfalls Rücksprache halten zu können, wurde ein nicht-anonymisierter Patientenfragebogen mit einer Einwilligungserklärung verfasst. Es wurde die Wohndauer in der Wingst, der Aufenthalt in Risikogebieten in Süddeutschland und Europa sowie die Anzahl an Zeckenstichen innerhalb der letzten 12 Monate abgefragt. Weiterhin wurden eine zuvor durchgemachte FSME- Erkrankung oder –Impfung, sowie Impfungen gegen Gelbfieber oder Japanische Enzephalitis erfragt. Des Weiteren sollte der Fragebogen Aufschluss über eine durchgemachte Borrelioseerkrankung geben.

#### **2.2.8 Methoden zur Untersuchung auf *Anaplasma phagozytophilum***

Die Untersuchung einer möglichen Durchseuchung der Zeckenpopulation der Wingst mit *A. phagozytophilum* erfolgte mittels real- time PCR. Diese ermöglichte einen direkten Nachweis bakterieller Nukleinsäure. Eine Erhöhung der Spezifität der PCR wurde durch eine anschließende Schmelzkurvenanalyse erreicht.

### 2.2.8.1 PCR zum Nachweis von *Anaplasma- phagozytophilum*- DNA und Detektion mittels Hybridisierungssonden und Schmelzkurvenanalyse

Zum Nachweis von *A. phagozytophilum* wurde eine real- time PCR (siehe Abschnitt 2.2.3 und 2.2.3.3) durchgeführt. Ihre Zielsequenz liegt auf der 16S rRNA und ist 345 bp lang. Die 16S rRNA ist Teil der bakteriellen Translation und wird häufig für phylogenetische Untersuchungen auf Grund stark konservierter Bereiche genutzt. Zu Beginn erfolgte die Extraktion der Nukleinsäure wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben. Anschließend wurde der Mastermix, wie in Tabelle 11 dargestellt, gekühlt und in einem separaten Raum in Light- Cyler- Kapillaren angesetzt. Die Sequenzen des in der real- time PCR verwendeten Primerpaars EHR-For/EHR- Rev entstammen der Veröffentlichung von Parola et al. aus dem Jahre 2000 (siehe Tabelle 12). Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Hybridisierungssonden wurden dankenswerterweise von Dr. Schaarschmidt- Kiener (Labor Alomed, Radolfzell-Böhringen) zur Verfügung gestellt. Nach Zugabe der extrahierten DNA zum PCR-Ansatz/Mastermix erfolgte eine Amplifikation nach dem in Tabelle 13 dargestellten Temperaturprotokoll. Die Detektion möglicher amplifizierter *A. phagozytophilum*- Nukleinsäure erfolgte mittels der im Mastermix enthaltenen Hybridisierungssonden. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wie in Abschnitt unter 2.2.3.2 erläutert (siehe Tabelle 14).

Reagenz	Volumen [µl] für einen Reaktionsansatz
Aqua ad.	6,6
MgCl <sub>2</sub>	2,4
Primer EHR- For	1
Primer EHR- Rev	1
Sonde EHR- Sens G F1	1
Sonde EHR- Anch red 640	1
LC FastStart DNA Master Hybridization Probes	2
DNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Tabelle 11: Reaktionsansatz für den Nachweis von *A. phagozytophilum* durch Amplifikation von 16S rRNA (Schaarschmidt- Kiener und Müller 2007).

Primer	Sequenz (5´-3´)
EHR- For	GGTACCYACAGAAGAAGTCC
EHR- Rev	TAGCACTCATCGTTTACAGC

Tabelle 12: Primer für den Nachweis von *A. phagozytophilum*- 16S rRNA (Parola et al. 2000).

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	120	1
Denaturierung	95	1	} 45
Annealing	55	16	
Elongation	72	20	

**Tabelle 13: Temperaturprotokoll für den Nachweis von *A. phagozytophilum* durch Amplifikation von 16S rRNA (Schaarschmidt- Kiener und Müller 2007).**

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	15	} 1
Annealing	40	15	
Schmelzkurve	95	0	

**Tabelle 14: Temperaturprotokoll für die Schmelzkurvenanalyse zum spezifizierten Nachweis von *A. phagozytophilum* durch Amplifikation von 16S rRNA (Schaarschmidt- Kiener 2008).**

In jeder PCR wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Bei der positiven Kontrolle handelte es sich um extrahierte *A. phagozytophilum*- DNA aus einem Zellkulturüberstand, die freundlicher Weise von Dr. Rainer Oehme, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, zur Verfügung gestellt wurde. Als negative Kontrolle diente im Reaktionsansatz Aqua ad..

#### **2.2.8.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von *A. phagozytophilum*- PCR- Amplifikaten**

Zur weiteren Kontrolle wurden mögliche *A. phagozytophilum*- haltige PCR- Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Hierzu wurden 10 µl Amplifikat mit 2 µl Gelladepuffer versetzt und in jeweils eine Geltasche eines 1,5 %igen Agarosegels pipettiert. Zum Größenabgleich der Amplifikate wurde parallel zu den Proben ein Längenstandard (100 Basenpaarleiter) aufgetragen. Wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben wurde der Elektrophoreselauf gestartet und die Nukleinsäure nach 20 Minuten Laufzeit mittels UV- Licht detektiert.

#### **2.2.8.3 Sequenzanalyse möglicher *A. phagozytophilum*- Amplifikate**

Die PCR Amplifikate wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Detektion zur Bestätigung des Ergebnisses einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Vorbereitung und Sequenzierung der Amplifikate erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 dargestellt. Die gelieferten Rohdaten wurden computergestützt mit einer speziellen Herstellersoftware in die Basensequenz umgewandelt und im Internet unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> mit Hilfe des Programms Blastn mit bereits bekannten Sequenzen abgeglichen.



## 2.2.9 Methoden zur Untersuchung auf *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Für die Untersuchung der Zeckenpopulation der Wingst auf eine Durchseuchung mit *B. burgdorferi* s. l. wurde eine PCR durchgeführt. Diese ermöglichte einen direkten Nachweis von Borrelien- DNA. Anschließend sollte die Zuordnung einiger exemplarisch ausgewählter und zuvor positiv getesteter Zecken zu den Genospezies mittels einer weiteren PCR erfolgen.

### 2.2.9.1 PCR zum Nachweis von *Borrelia- burgdorferi- sensu- lato- DNA* und anschließender Detektion mittels Taq- man- Sonden

Zum Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. wurde eine real- time PCR (siehe Abschnitt 2.2.3.1) mit dem Artus Borrelia LC PCR Kit von Qiagen verwendet. Diese PCR amplifiziert eine 102 bp lange Zielsequenz innerhalb des Flagellin- Gens. Das in dem Kit enthaltene Primerpaar ermöglicht die Detektion von *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. hensii*. Zu Beginn wurde Nukleinsäure aus Zecken extrahiert (siehe Abschnitt 2.2.2.2), dann der Mastermix gekühlt in einem separaten Raum in Light- Cycler- Kapillare vorgelegt (siehe Tabelle 15). Nach Zugabe der extrahierten DNA wurde die Amplifikation nach dem Temperaturprotokoll durchgeführt siehe (Tabelle 16).

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l] für einen Reaktionsansatz
Borreliä LC Master	15
DNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

**Tabelle 15: Reaktionsansatz für den Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. durch Amplifikation eines Nukleinsäureabschnittes innerhalb des Flagellin- Gens.**

Reaktionsschritt	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	15	1
Denaturierung	95	1	} 45
Annealing	60	20	
Elongation	72	20	
	40	30	

**Tabelle 16: Temperaturprotokoll für den Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. durch Amplifikation eines Nukleinsäureabschnittes innerhalb des Flagellin- Gens.**

Durch Fluoreszenzfarbstoff- gekoppelte, spezifische Taq- man- Sonden war eine Detektion noch während der der Amplifikation mittels UV- Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm möglich. Die

bereits seit der DNA- Extraktion mitgeführte interne Borrelienkontrolle wurde bei UV- Licht mit einer Wellenlänge von 610 nm sichtbar.

### 2.2.9.2 Differenzierung der Genotypen

In Zecken nachgewiesene *B. burgdorferi* s. l.- Bakterien sollten zur Bestimmung der Zugehörigkeit zu den Genospezies einer weiteren real- time PCR unterzogen werden. Die verwendete PCR von Pietila et al. aus dem Jahre 2000 amplifiziert mittels des Primerpaares nTM17.F/nTM17.R (siehe Tabelle 17) eine 222 bp lange Nukleinsäuresequenz innerhalb des recA- Gens. Dieses Gen ist als Teil der Erbinformation von *B. burgdorferi* s. l. für die homologe Rekombination zuständig. Zu Beginn der PCR wurde der Mastermix laut Pipettierschema in Tabelle 18 gekühlt in einem separaten Raum vorgelegt. Die Aufbereitung der DNA (siehe Abschnitt 2.2.2.2) war bereits für den qualitativen Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. beziehungsweise *A. phagozytophilum* (siehe Abschnitt 2.2.2.2) durchgeführt worden. Daher konnte die DNA direkt zu dem Mastermix hinzupipettiert und die Amplifikation in einem Light Cycler laut Temperaturprotokoll aus Tabelle 19 gestartet werden. Die Detektion der PCR- Amplifikate erfolgt unspezifisch mittels SYBR Green I und einer Schmelzkurvenanalyse (siehe Tabelle 20). Diese PCR erlaubt eine Bestimmung der Genotypen *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s. s. und *B. afzelii*. Auf Grund identischer Schmelzpunkte ist eine Abgrenzung von *B. burgdorferi* s. s. und *B. afzelii* von anderen Genotypen möglich, eine Differenzierung zwischen *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s. s. jedoch nicht, da kein

Primer	Sequenz (5'-3')
nTM17.F	GTGGATCTATTGTATTAGATGAGGCTCTCG
nTM17.R	GCCAAAGTTCTGCAACATTAACACCTAAAG

Tabelle 17: Primer für den Nachweis und die Differenzierung von *B. burgdorferi* s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens (Pietila et al. 2000).

Reagenz	Volumen [µl] für einen Reaktionsansatz
Aqua ad.	10,2
MgCl <sub>2</sub>	1,6
LC DNA Master SGI	2
Primer nTM17.F	0,4
Primer nTM17.R	0,4
TaqStart antibody	0,4
DNA	5
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Tabelle 18: Reaktionsansatz für den Nachweis und die Differenzierung von *B. burgdorferi* s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens (Pietila et al. 2000).

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	40	1
Denaturierung	95	1	} 50
Annealing	59	5	
Elongation	72	11	

Tabelle 19: Temperaturprotokoll für den Nachweis und die Differenzierung von *B. burgdorferi* s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens (Pietila et al. 2000).

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	?	} 1
Annealing	55	20	
Schmelzkurve	94	0	

Tabelle 20: Temperaturprotokoll der Schmelzkurvenanalyse für den Nachweis und die Differenzierung von *B. burgdorferi* s. l.- Genospezies mittels real- time PCR auf Grundlage des recA- Gens (Pietila et al. 2000).

Genotyp	Schmelzpunkt
<i>B. afzelii</i> / <i>B. burgdorferi</i> s. s.	83,3 °C ± 0,5 °C
<i>B. garinii</i>	82,1 °C ± 0,5 °C
<i>B. valaisiana</i>	81,5 °C ± 0,5 °C

Tabelle 21: Spezifische Schmelztemperaturen zur Differenzierung der einzelnen Genotypen von *B. burgdorferi* s. l. (Pietila et al. 2000).

signifikanter Unterschied zwischen ihren Schmelzpunkten besteht. Bei jeder PCR wurden eine positive und eine negative Kontrolle mitgeführt. Bei der positiven Kontrolle handelte es sich um eine Probe aus einem Ringversuch zur Qualitätssicherung des Labors. Die negative Kontrolle beinhaltete Aqua ad. statt Zeckenextrakt.

### 3 Ergebnisse

In den Frühsommer- und Herbstmonaten der Jahre 2008 und 2009 wurden, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, 3.392 Nymphen- Zecken und 779 adulte Zecken gesammelt. Hiervon wurden 3.231 Nymphen, 182 adulte Weibchen und 275 adulte Männchen aus beiden Sammeljahren auf eine Infektion mit FSMEV untersucht. Die restlichen 483 Zecken wurden in Einzeluntersuchungen auf eine Durchseuchung mit *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. untersucht.

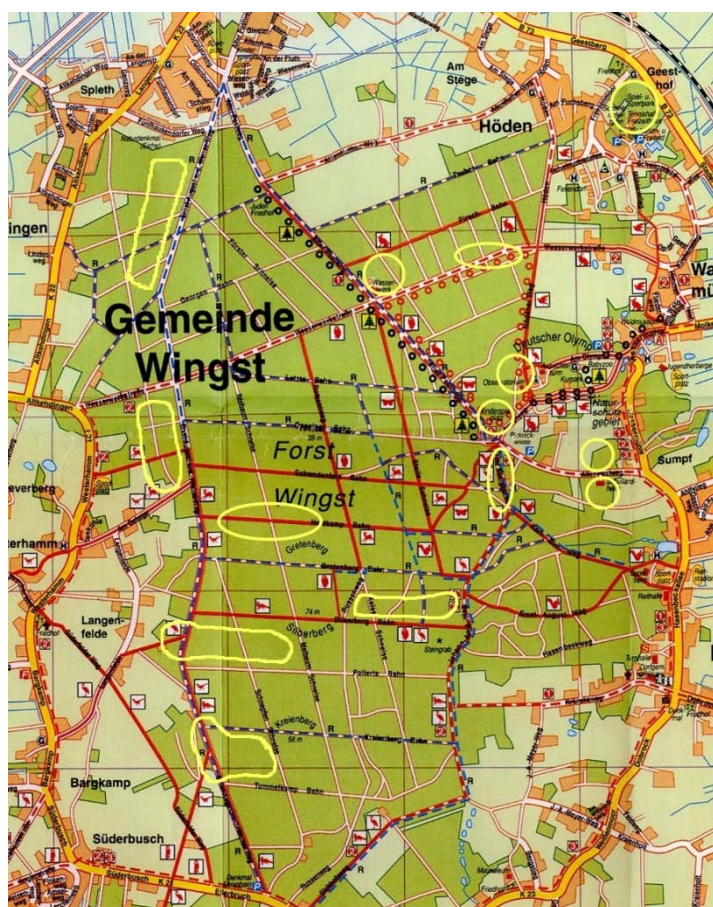


Abbildung 9: Genaue Kartierung der Gemeinde Wingst, --- gelbumfasst Sammelorte der Jahre 2008 und 2009 (Auszug aus I&W Plan, Piechottka: Landkarte der Gemeinde Wingst, Maßstab 1:20.000).

Für eine genaue Differenzierung der Untersuchung wurde die Wingst zuvor schachbrettmusterartig kartiert. Die einzelnen Sammelorte wurden nach Weg und Pflanzenbewuchs so festgelegt, dass ein Maximum an Zecken gesammelt werden konnte. Im Falle positiv getesteter Zecken wären Rückschlüsse auf einen Zusammenhang des Sammelortes mit beispielsweise den Wohnorten der autochthon infizierten Patienten möglich. Weiterhin wurden die Sammelorte so gewählt, dass sie beispielsweise als Trimm- dich- Pfade, Wanderwege oder durch die Nähe zum Landschulheim oder den Waldspielplatz durch Bewohner oder Besucher der Wingst hochfrequentierten Gebieten entsprechen. Die Kartierung der Region ist in Abbildung 9

dargestellt. Die Sammlung der Zecken erfolgte mittels Zeckenfahnen, wobei die Zecken von der Vegetation mit Hilfe der Fahne abgestreift und abgesammelt worden waren. Sammeltermine waren vom frühen Vor- bis Nachmittag an sonnigen, feucht- warmen Tagen.

### 3.1 Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren

Da Durchseuchungsraten von Zeckenpopulationen in FSME- Risikogebieten verhältnismäßig gering sind, muss man davon ausgehen, dass in Nicht- Risikogebieten wie Niedersachsen das Verhältnis infizierter zu nicht infizierten Zecken noch deutlicher ausfällt. Deshalb ist von einer Einzeluntersuchung jeder Zecke auf FSMEV abgesehen worden. Stattdessen wurden Zeckenpools zur Untersuchung eingesetzt. Hierzu wurden Nymphen- Zecken beziehungsweise männliche adulte Zecken desselben Sammelzeitpunktes und Sammelortes in Zehner-, entsprechende weibliche adulte Zecken in Fünfergruppen untersucht. Wie in Tabelle 22 dargestellt entstanden insgesamt 389 Pools aus 3.688 Zecken.

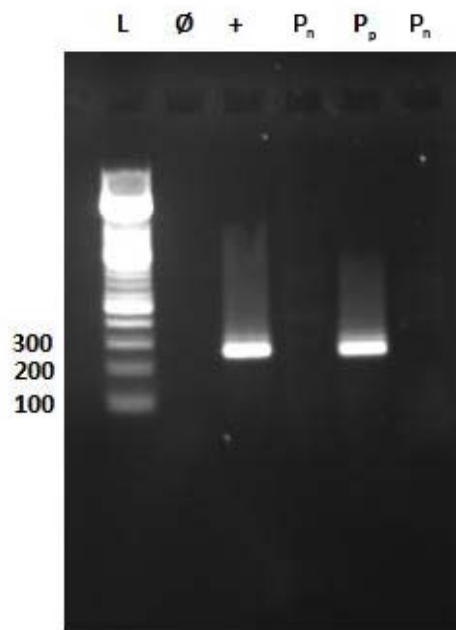
	<b>Nymphen</b>	<b>männliche Adulte</b>	<b>weibliche Adulte</b>	<b>insgesamt</b>
<b>Anzahl (2008/2009)</b>	3231 (2220 / 1011)	275 (200 / 75)	182 (130 / 52)	3688
<b>Pools</b>	324	28	37	389

Tabelle 22: Anzahl der auf eine Durchseuchung mit FSMEV untersuchten Zecken.

#### 3.1.1 Nachweis von Frühsommermeningoenzephalitis- Viren

Wie in Abschnitt 2.2.2.1 und 2.2.6.1 beschrieben wurden pro Untersuchungsdurchgang jeweils zehn Zeckenpools aufgearbeitet und mittels nested PCR untersucht. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung (siehe Abschnitt 2.2.6.2) wurde das Gel unter UV- Licht mittels der Fotodokumentationsanlage dokumentiert. Bei einem positiven Amplifikationsergebnis sollte ein 252 bp langes DNA- Fragment zu sehen sein. Aus dem verbliebenen aufgearbeiteten Nukleinsäurematerial des entsprechenden Zeckenpools sollte daraufhin eine Sequenzierung, wie in Abschnitt 2.2.6.3 beschrieben, zur Bestätigung des Amplifikationsergebnisses erfolgen.

Unter allen getesteten Zeckenpools (siehe Abschnitt 3.1, Tabelle 22) konnte in einem Pool bestehend aus zehn männlichen adulten Zecken nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate eine Bande im gesuchten Bereich von 252 bp detektiert werden. In Abbildung 10 ist die zugehörige Fotodokumentation dargestellt. Somit wurde ein Pool auf die Infestation mit FSMEV als positiv gewertet. Die mitgeführten positiven als auch negativen Kontrollen wurden in allen Durchläufen jeweils positiv beziehungsweise negativ getestet.



**Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR- Amplifikate zum Nachweis von FSMEV. Es wurden auf das Gel auf Spur L der Längenstandard, auf Spur Ø die negative Kontrolle, auf Spur + die positive Kontrolle, auf Spur Pp und Pn der positive beziehungsweise ein negativer Zecken- Pool aufgetragen. In Spur + und Pp konnte Nukleinsäure detektiert werden.  
L: DNA Längenstandard (100 bp Leiter), +: positive Kontrolle, Ø: negative Kontrolle, Pp: positiver Zeckenpool, Pn: negativer Zeckenpool**

Um sowohl durch eine Kontamination hervorgerufene falsch positive Ergebnisse auszuschließen als auch um die Menge an Virusmaterial im Zeckenpool zu bestimmen, wurden Verdünnungsreihen des positiven Zeckenpools wie auch der positiven Kontrolle hergestellt. Hierbei wurden beide Amplifikate in Zehnerschritten verdünnt und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und fotodokumentiert. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, konnte das Amplifikat der positiven Zeckenpool- Probe bis zu einer  $10^6$ fachen Verdünnung detektiert werden. Das der positiven Kontrolle zeigte lediglich bis zu einer einhundertfachen ( $10^2$ ) Verdünnung ein Signal. Damit ist zum einen eine Verunreinigung der Probe durch die positive Kontrolle ausgeschlossen, zum anderen konnte eine mindestens 10.000fach höhere Konzentration der Viruslast im positiv getesteten Zeckenpool im Vergleich zur positiven Kontrolle gefunden werden.

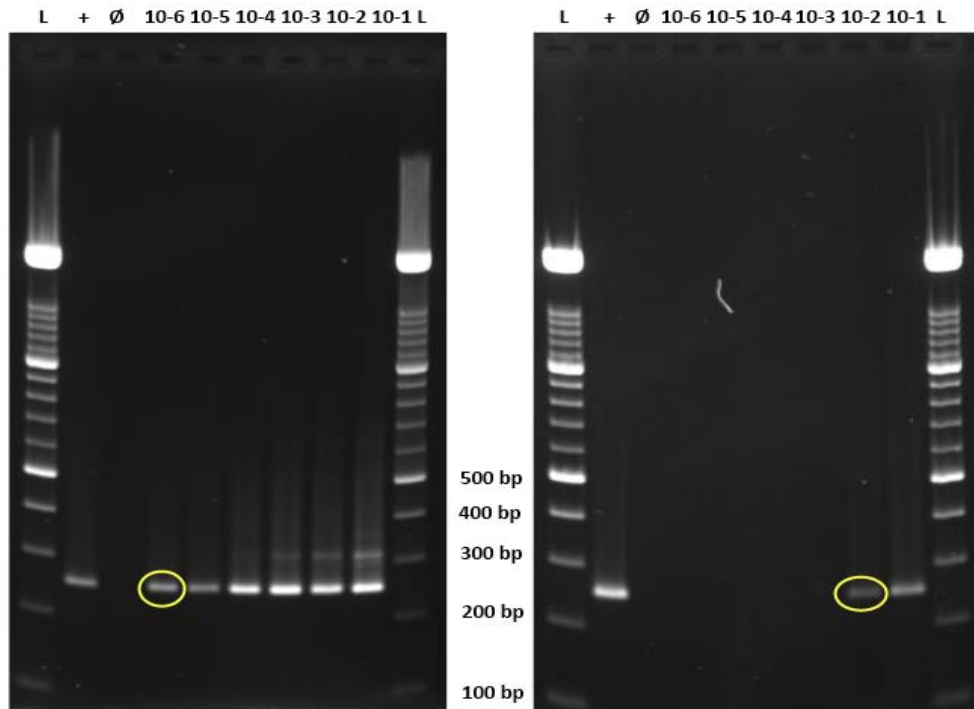


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung von Verdünnungsreihen hergestellt aus den PCR-Amplifikaten des positiv getesteten Zeckenpools (links) und der mitgeführten positiven Kontrolle (FSME-Zellkulturüberstand, rechts) zum Nachweis von FSMEV. Es wurden auf beiden Gelen jeweils auf Spur L der Längenstandard, auf Spur Ø die negative Kontrolle, auf Spur + die unverdünnte positive Kontrolle, auf alle weiteren Spuren Zecken- Pools in der Verdünnung entsprechend der Beschriftung aufgetragen. Die Verdünnung sowohl der positiven Kontrolle als auch des positiven Zecken- Pools betrug maximal  $10^{-6}$ . Die amplifizierte Nukleinsäure der positiven Kontrolle konnte bis zu einer Verdünnung von maximal  $10^{-2}$ , die des Zeckenpools dagegen mit einer Verdünnung bis maximal  $10^{-6}$  detektiert werden.

L: DNA Längenstandard (100 bp Leiter), +: unverdünntes Amplifikat des positiv getesteten Zeckenpools beziehungsweise der positive Kontrolle, Ø: negative Kontrolle,  $10^{-x}$ : Verdünnungsstufe des Amplifikats

### 3.1.2 Sequenzanalyse des Frühsommermeningoenzephalitis- Viren- Amplifikats

Für die Sequenzanalyse wurden die Amplifikate sowohl des positiv getesteten Zeckenpools als auch der positiven Kontrolle mit dem QIAquick PCR Purification Kit, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, gereinigt und an das Göttinger Labor SeqLab zur Sequenzanalyse gegeben. Hierbei wurde der mittels PCR vervielfältigte Genbereich des NS5- FSMEV- Gens als Grundlage genommen. Mit Hilfe der auf Seite 33 in Tabelle 7 dargestellten Primer wurde ein 252 bp langer Abschnitt des NS5- Gens amplifiziert. Die hierbei erhaltenen Nukleinsäureabfolgen des Amplifikats der positiven Zeckenpool- Probe als auch der positiven Kontrolle stimmten mit der bereits bekannten FSMEV- Nukleotidsequenz mit der Genbanknummer DQ153877.1 zu 98 % beziehungsweise 99 % überein. Das Ergebnis der PCR und damit eine Infestation der untersuchten Zecken mit FSMEV wurde somit eindeutig bestätigt. In Abbildung 12 sind die ermittelten Nukleinsäureabfolgen im Vergleich zu der in der Genbank bereits vorliegenden dargestellt.

P <sub>Zecke</sub>		AGA-CAATATGGGATTGGCTGTCTCGCGGGGCACGGCAAAGCTTGCCTGGCTTGAGGAACGCGG	
DQ153877.1	7808	AGACCAATATGGGATTGGCTGTCTCTCGGGGCACGGCAAAGCTTGCCTGGCTTGAGGAACGCGG	7871
P <sub>Zecke</sub>		ATATGCCACCCCTCAAGGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGGAAGGGGCGGCTGGTCCTA	
DQ153877.1	7872	ATATGCCACCCCTCAAGGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGGAAGGGGCGGCTGGTCCTA	7931
P <sub>Zecke</sub>		TTATGCGGCATCCCGACCGGCAGTCATGAGTGTGAGGGCATAACCATTTGGTGAAGAGG	
DQ153877.1	7932	TTATGCGGCATCCCGACCGGCAGTCATGAGTGTGAGGGCATAACCATTTGGTGAAGAGG	7991
P <sub>Zecke</sub>		GCACGAGGCTCCAAAGATGA-AACAAGC	
DQ153877.1	7992	GCACGAGGCTCCAAAGATGGTAACAAGC	8019
P <sub>Kon</sub>		GAGAGACAATATGGGATTGGCTGTCTCGCGGGGCACGGCAAAGCTTGCCTGGCTTGAGGAACGCGG	
DQ153877.1	7805	GAGAGACAATATGGGATTGGCTGTCTCGGGGCACGGCAAAGCTTGCCTGGCTTGAGGAACGCGG	7871
P <sub>Kon</sub>		ATATGCCACCCCTCAAGGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGGAAGGGGCGGCTGGTCCTA	
DQ153877.1	7872	ATATGCCACCCCTCAAGGGAGAGGTGGTAGATCTTGGATGTGGAAGGGGCGGCTGGTCCTA	7931
P <sub>Kon</sub>		TTATGCGGCATCCCGACCGGCAGTCATGAGTGTGAGGGCATAACCATTTGGTGAAGAGG	
DQ153877.1	7932	TTATGCGGCATCCCGACCGGCAGTCATGAGTGTGAGGGCATAACCATTTGGTGAAGAGG	7991
P <sub>Kon</sub>		GCACGAGGCTCCAAAGATGATAACAAGC	
DQ153877.1	7992	GCACGAGGCTCCAAAGATGGTAACAAGC	8019

**Abbildung 12:** In der Sequenzanalyse untersuchte Nukleotidabfolge der auf FSMEV positiv getesteten Zeckenprobe (P<sub>Zecke</sub>, oben) und der positiven Kontrolle (P<sub>Kon</sub>, unten) im Vergleich zu der Nukleotidabfolge der bereits bekannten FSMEV- Nukleotidabfolge mit der Genbanknummer DQ153877.1 im Bereich der 7808. bis 8019. beziehungsweise der 7805. bis 8019. Nukleotide der Originalsequenz. Unterschiede der getesteten Nukleotidsequenzen mit DQ153877.1 sind gelb markiert. 98 % beziehungsweise 99 % der Sequenzen sind übereinstimmend.

### 3.1.3 Statistische Auswertung der Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in Zecken

Eine Überprüfung ergab, dass die Anzahl an untersuchten Zecken ausreichend für eine aussagekräftige statistische Auswertung ist. Sie wurde dankenswerterweise durch Dr. Jung, Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen, vorgenommen.

Da von einer sehr geringen Infektionsrate der Zecken mit FSMEV ausgegangen werden musste, wurden die Zecken in Pools untersucht. Hierbei wurde ein Pool bestehend aus zehn männlichen adulten Zecken positiv getestet. Die Prävalenz infestierter Zecken kann durch die folgende Formel nach Abel et al. (1999) geschätzt werden:



$$P = 1 - (1 - x_p / n_p)^{1/c}$$

**P: geschätzte Prävalenz;  $x_p$ : positiv getestete Pools;  $n_p$ : Anzahl getesteter Pools; c: Poolgröße**

Nach dieser Formel wurde eine durchschnittliche Prävalenz von 0,053 % mit einem 95 %-Konfidenzintervall  $KI = [6,86 \times 10^{-6}; 1,51 \times 10^{-3}]$  geschätzt.

### **3.1.4 Auswertung der Untersuchung zur Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in der Bevölkerung der Wingst**

Von zwei Hausärzten der Wingst konnten 33 Einwohner aus dieser Region als Probanden für die Untersuchung zur Prävalenz von spezifischen FSMEV- IgG- Antikörper rekrutiert werden. Die Einwilligungserklärung des nicht anonymisierten Fragebogens wurde von allen Teilnehmern der Studie unterzeichnet. Die Probanden waren im Durchschnitt 63 Jahre alt (27- 81 Jahre, Median 63 Jahre) und lebten durchschnittlich seit 33 Jahren in der Wingst (2- 77 Jahre, Median 33 Jahre).

17 der Teilnehmer gaben einen Aufenthalt ohne erinnerlichen Zeckenstich in Risikogebieten an. Lediglich fünf von ihnen spezifizierten ihren Aufenthalt an Hand der mitgelieferten Karte und gaben hierbei Bayern als Urlaubsort an. Weitere elf Teilnehmer verneinten den Aufenthalt in einem Risikogebiet. Die verbleibenden fünf Probanden machten keine Aussage bezüglich eines Aufenthalts in Risikogebieten.

Alle 33 Teilnehmer gaben an, weder gegen FSME noch gegen Japanische Enzephalitis geimpft zu sein. Ein Teilnehmer berichtete über die Gabe von Immunglobulinen nach einem Zeckenstich, verneinte jedoch eine FSME- Erkrankung.

25 der Probanden gaben an, in den letzten zwölf Monaten keinen Zeckenstich erlitten zu haben. Sechs von ihnen konnten sich an einen bis zehn Stiche erinnern und ein Proband berichtete von elf bis 20 Zeckenstichen. Ein Teilnehmer machte keine Angabe zu der Anzahl der Zeckenstiche.

Auf die Frage nach durchgemachten Erkrankungen nach Zeckenstich gaben drei Probanden eine Lyme- Borreliose, keiner eine FSME an.

3 aller 33 untersuchter Probandenseren zeigten einen erhöhten Antikörpertiter in der Untersuchung mittels ELISA. Im anschließend durchgeführten Neutralisationstest konnte das Ergebnis in allen drei Fällen bestätigt werden. Zwei dieser Probanden gaben an, ungeimpft zu sein, sich dafür aber in einem Risikogebiet in Bayern aufgehalten zu haben. Daher ist bei beiden eine natürliche Infektion in einem Risikogebiet anzunehmen. Allein bei dem verbleibenden,

ebenfalls ungeimpften Studienteilnehmer ist ohne Aufenthalt in einem Risikogebiet von einer autochthonen Infektion auszugehen.

Auf Grund der geringen Anzahl an Probanden und der Tatsache, dass die Probanden durch ihren Arztbesuch vorselektiert wurden, wäre eine statistische Auswertung des Fragebogens nicht aussagekräftig, weshalb darauf verzichtet wurde.

### 3.2 Untersuchung auf *Anaplasma phagozytophilum*

Wie schon in Abschnitt 3 erwähnt wurden 483 Zecken separat auf eine Durchseuchung mit *A. phagozytophilum* untersucht. In Tabelle 23 ist die Verteilung der untersuchten Zecken auf Nymphen, männliche und weibliche adulte Zeckenstadien, beschrieben.

	Nymphen	Männliche Adulte	Weibliche Adulte	Insgesamt
Anzahl	161	165	157	483

Tabelle 23: Anzahl der auf *A. phagozytophilum* untersuchten *I. ricinus*, unterschieden nach Entwicklungsstadium beziehungsweise Geschlecht.

#### 3.2.1 Nachweis von *Anaplasma phagozytophilum*

Für den Nachweis von *A. phagozytophilum* wurde in jedem Untersuchungsdurchlauf aus jeweils 30 Zecken separat, wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben, Nukleinsäure extrahiert. Mittels einer real-time PCR (siehe Abschnitt 2.2.3.3 und 2.2.8.1) wurde die Nukleinsäure der 16S rRNA untersucht. Die gemessenen Fluoreszenzsignale der eingesetzten spezifischen Hybridisierungs sonden wurden digital an einen Computer weitergeleitet und als Kurve gegen die Anzahl an bisher durchlaufenen Temperaturzyklen aufgetragen. Zur Verbesserung der Spezifität der PCR wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierbei wurden alle Amplifikate die - ebenso wie die positive Kontrolle - einen Peak in der Schmelzkurve bei 69 °C zeigten, als infiziert mit *A. phagozytophilum* gewertet. 210 der untersuchten Proben (durchschnittlich 43,48 %) zeigten unvorhergesehenerweise einen zusätzlichen oder alleinigen Peak in der Schmelzkurvenanalyse bei 53 °C. Fünf beziehungsweise drei exemplarisch ausgewählte Amplifikate mit jeweils einem Peak bei 53 °C beziehungsweise bei 69 °C wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und konnten anschließend detektiert werden. Auf Grund der Fragmentgröße der amplifizierten Nukleinsäuren konnte zusätzlich keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Das Amplifikat der Nukleinsäure von

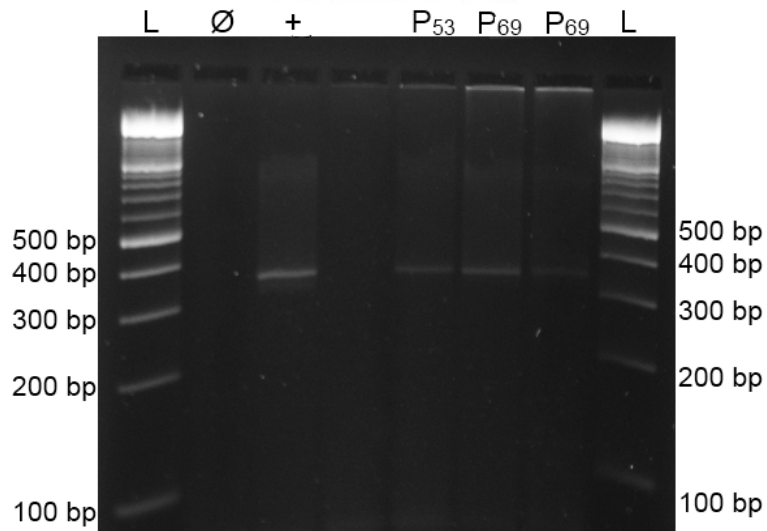
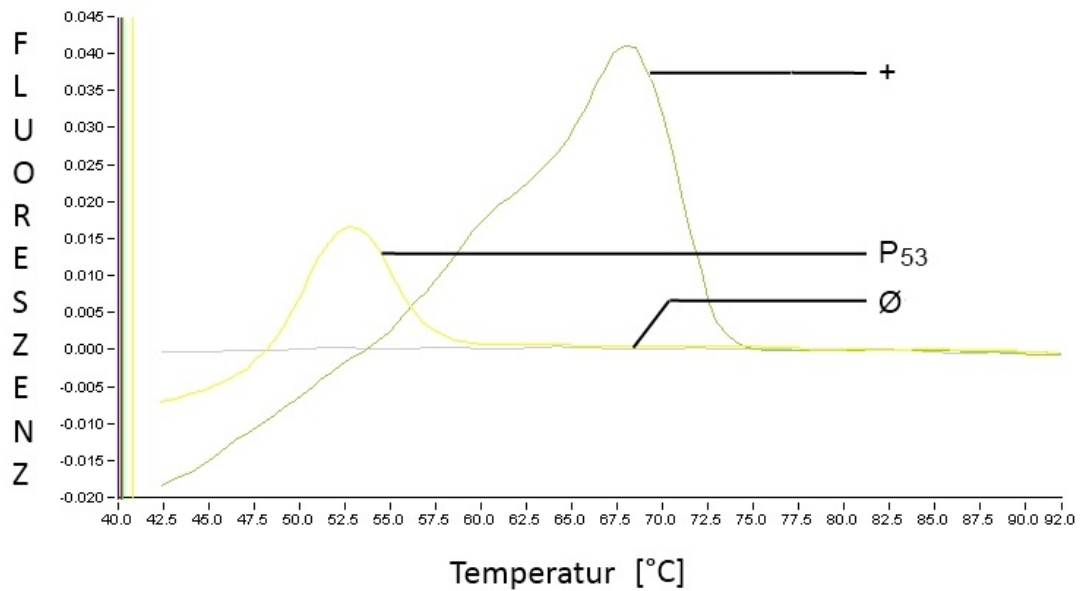
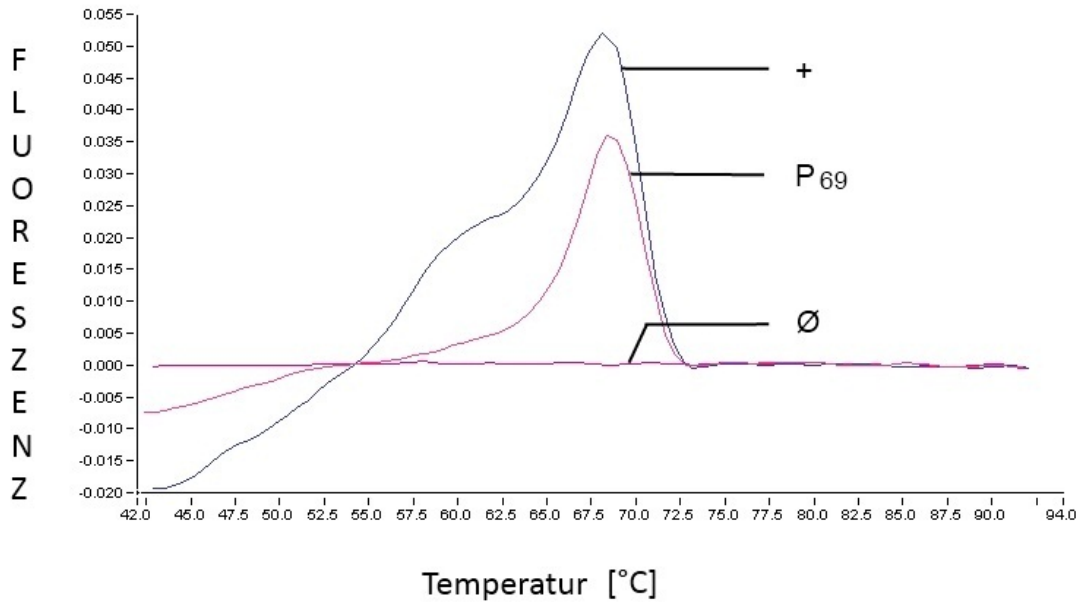


Abbildung 13: Nachweis von *A. phagozytophilum*. Typischer Schmelzkurvenverlauf nach PCR: Die positive Kontrolle (+) zeigt den charakteristischen Peak bei 69 °C, ebenso die Zeckenprobe P<sub>69</sub>(oben). Die Zeckenprobe P<sub>53</sub> weist den unbekanntem Peak bei 53 °C (Mitte) auf. Im Anschluss wurden beide Amplifikate gelelektrophoretisch aufgetrennt und dargestellt (unten). Beide zeigten eine Größe von etwa 350 bp.

+: positive Kontrolle, Ø: negative Kontrolle, P<sub>69</sub> und P<sub>53</sub> Zeckenproben, L: Längenstandard, bp: Basenpaaranzahl.

*A. phagozytophilum* hatte eine Größe von 345 bp. Zusätzlich wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.3). In Abbildung 13 sind die Kurvenverläufe einer Schmelzkurvenanalyse mit einem Peak bei 53 °C sowie 69 °C und eine anschließende gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate dargestellt.

### 3.2.2 Statistische Auswertung der Untersuchung auf *Anaplasma phagozytophilum* in Zecken

29 aller 483 getesteten Zecken zeigten in der Schmelzkurvenanalyse den charakteristischen Peak bei 69 °C und wurden daher positiv auf eine Infestation mit *A. phagozytophilum* gewertet.

Dies entspricht einer mittleren Durchseuchung von 6,39 % mit einem 95 %- Konfidenzintervall von [0,43; 0,09]. Die Infektionsraten, getrennt nach Entwicklungsstadium beziehungsweise Geschlecht bestimmt, sind Tabelle 24 zu entnehmen. Der Vergleich der Prävalenzen von Nymphen- Zecken, männlichen und weiblichen Zecken erbrachte keinen signifikanten Unterschied.

	Nymphen	Männliche Adulte	Weibliche Adulte	Insgesamt
<b>Anzahl positiv getesteter Zecken</b>	10	6	13	29
<b>Durchschnittliche Prävalenz</b>	6,62 %	3,77 %	9,03 %	6,39 %
<b>95 %- Konfidenzintervall</b>	[0,03; 0,12]	[0,01; 0,08]	[0,05; 0,15]	[0,04; 0,09]

Tabelle 24: Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle von *A. phagozytophilum*-infizierten Zecken, ihren Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechtern.

### 3.2.3 Sequenzanalyse der PCR- Amplifikate zum Nachweis auf *Anaplasma phagozytophilum*

Sowohl um das Ergebnis der PCR zu bestätigen als auch um in Erfahrung zu bringen, welche Nukleinsäuresequenz den Peak der Schmelzkurvenanalyse bei 53 °C hervorrief, wurden mit drei der auf *A. phagozytophilum* positiv getesteten Amplifikate und mit fünf Amplifikaten mit einem Schmelzpunkt bei 53 °C Sequenzanalysen exemplarisch durchgeführt.

#### *A. phagozytophilum*

Die Sequenzanalyse von zwei der drei zuvor mittels PCR positiv auf *A. phagozytophilum* (Schmelzpunkt 69°C) getesteten und mittels gelelektrophoretischer Auftrennung bestätigten Amplifikate zeigten eindeutige Sequenzdaten. Der Abgleich mit bereits bekannten

Nukleotidsequenzen ergab eine 96 %ige Übereinstimmung mit dem 16S rRNA- Genbereich von *A. phagozytophilum* der Genbanknummer HQ630623.1 beziehungsweise eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem 16S rRNA- Gen einer Ehrlichienpezies, zu der auch *A. phagozytophilum* zählt. Somit konnte das PCR- Amplifikationsergebnis über die Sequenzierung bestätigt werden. In der Abbildung 14 ist eine der ermittelten Nukleotidsequenzen dargestellt.

A.p.		TTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATG-A-GCGGAGTCG-AAAGTTAAAGGTGAAATGC	98
HQ630623.1	449	TTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGT-TCGGTAAGTTAAAGGTGAAATGC	507
A.p.		CAGGGCTTAACCCTGGAGCTGCATTTTAATACTGCCAGAC--GAGTCCGGGAGAGGATAG	158
HQ630623.1	508	CAGGGCTTAACCCTGGAGCTGC-TTTTAATACTGCCAGACTAGAGTCCGGGAGAGGATAG	566
A.p.		CGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGCAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG	218
HQ630623.1	567	CGGAATTCCTAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGG	626
A.p.		CGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGC-AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	278
HQ630623.1	627	CGGCTATCTGGTCCGGTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	686
A.p.		ATACCCTGGTAGTCCACGCT	298
HQ630623.1	687	ATACCCTGGTAGTCCACGCT	706

**Abbildung 14:** In der Sequenzanalyse ermittelte Nukleotidabfolge eines PCR- Amplifikats zum Nachweis auf *A. phagozytophilum* mit einem Peak in der Schmelzkurve bei 69 °C (A.p., obere Reihen) im Vergleich zu der bereits bekannten *A. phagozytophilum*- Nukleotidsequenz mit der Genbanknummer HQ630623.1 (untere Reihen). Beide sind zu 96 % identisch. Unterschiede der Sequenzen sind gelb markiert.

### ***Candidatus Midichloria mitochondrii***

Die Sequenzierung der Amplifikate mit einem Peak in der Schmelzkurvenanalyse bei 53 °C gelang in allen fünf untersuchten Proben. Der Abgleich der Nukleotidabfolgen mit der Datenbank ergab eine 92 bis 97 %ige Übereinstimmung mit dem Bakterium *Candidatus Midichloria mitochondrii* (*C. Midichloria m.*). Beispielsweise wurde in Abbildung 15 eine ermittelte Sequenz mit der bereits veröffentlichten der Genbanknummer GU734326.1 verglichen. 43,48 % der untersuchten Zecken wiesen einen solchen Peak bei circa 53 °C auf und wurden daher als infiziert mit *C. Midichloria m.* gewertet. Es waren 1,24 % der Nymphen-, 43,03 % der männlichen und 87,26 % der weiblichen Zecken betroffen. Eine bei der Sequenzanalyse ermittelte Nukleinsäureabfolge ist Abbildung 15 zu entnehmen.

Query	35	ACTCGGAATTATTGGGCGTAAAG-GTGCCTAGGCTGCT-AGTAAGTCAAAAGTGAAAGCC	94
Sbjct	16	ACTCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCTGCTTAGTAAGTCAAAAGTGAAAGCC	75
Query	95	TTGGGCTCAACCTAAGAATTGCTTTTGAAGTACCAAGCTTGAGTACTGTAGGGGATAGC	154
Sbjct	76	TTGGGCTCAACCTAAGAATTGCTTTTGAAGTACCAAGCTTGAGTACTGTAGGGGATAGC	135
Query	155	GGAATTCCTAGCTGTAGGGGTGAAATTCG-AGATATTAGGAGGAACACC-GAGGCGAAAG	214
Sbjct	136	GGAATTCCTAG-TGTAGGGGTGAAATTCGTAGATATTAGGAGGAACACCGGAGGCGAAAG	194
Query	215	CGGTTATCTGGACAGTTACTGACGCTGTTGCAC-AAAGC-TGGGGAGCAAACAGGATTAG	274
Sbjct	195	CGGTTATCTGGACAGTTACTGACGCTGTTGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG	254
Query	275	ATACCCTGGTAGTCCACGCT-TAAAC-ATGAGTGCTAA	312
Sbjct	255	ATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAA	292

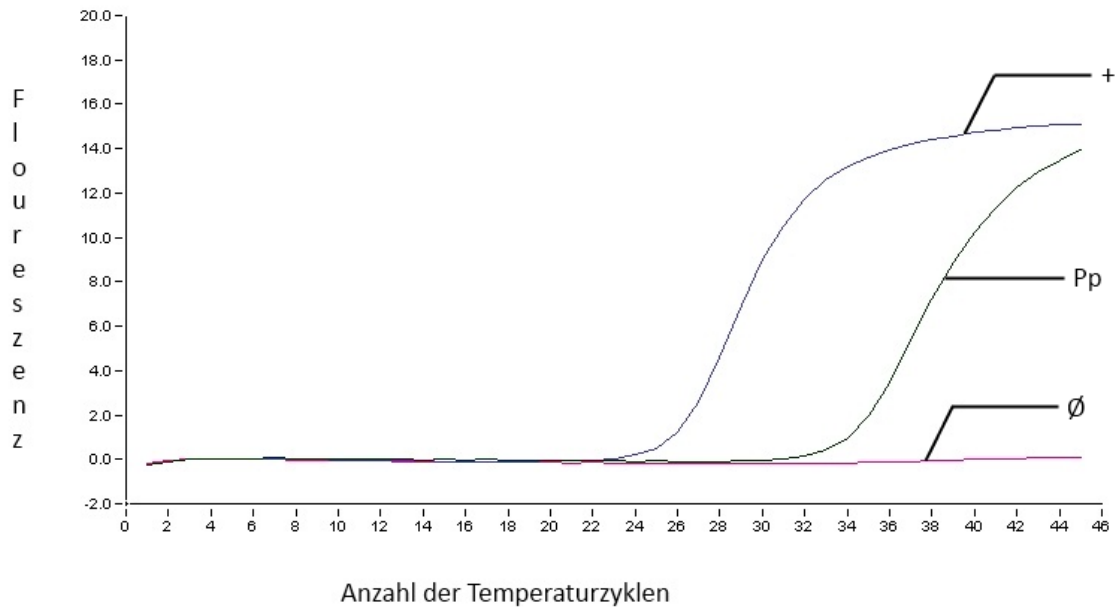
**Abbildung 15:** In der Sequenzanalyse ermittelte Nukleotidabfolge eines PCR- Amplifikats zum Nachweis auf *A. phagozytophilum* (obere Reihe) mit einem Peak in der Schmelzkurve bei 53 °C im Vergleich zu der bereits bekannten Nukleotidsequenz von *C. Midichloria mitochondrii* mit der Genbanknummer GU734326.1 (untere Reihen). Beide Sequenzen sind zu 97 % identisch. Unterschiede wurden gelb markiert.

### 3.3 Untersuchung der Zecken auf *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Die Untersuchung auf *B. burgdorferi* s. l. erfolgte aus Zecken, die ebenfalls auf eine Infektion mit *A. phagozytophilum* getestet wurden. Daher ist das untersuchte Kollektiv identisch und umfasst 483 Zecken, zusammengesetzt aus 161 Nymphen- Zecken, 165 männlichen und 157 weiblichen adulten Zecken. Eine weitere anschließend durchgeführte real- time PCR ermöglichte die Untersuchung von 20 der bereits positiv getesteten Zecken auf ihre Zugehörigkeit zu den Genospezies.

#### 3.3.1 Nachweis von *Borrelia burgdorferi sensu lato*

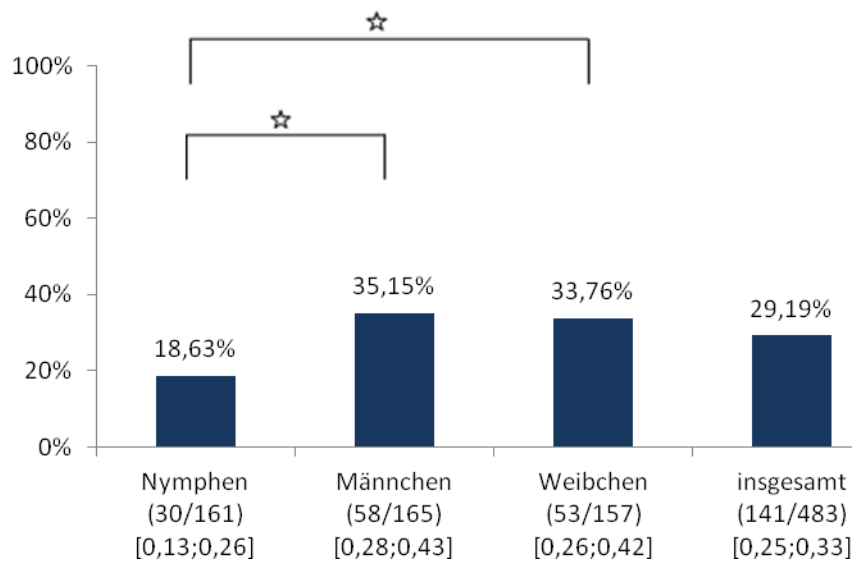
Für den Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. wurde die Nukleinsäure von Zecken verwendet, die bereits für die Untersuchung auf *A. phagozytophilum* extrahiert wurde (siehe Abschnitt 2.2.2.2). Jeweils 30 Zecken wurden innerhalb eines Untersuchungsdurchlaufs mittels einer real- time PCR untersucht (siehe Abschnitt 2.2.9.1). Durch die PCR wurde ein 102 bp langer Nukleinsäureabschnitt aus dem Flagellin- Gen amplifiziert. Die Detektion erfolgte durch Nutzung spezifischer Taq- man- Sonden. Die gemessenen Fluoreszenzsignale wurden digital an einen Computer weitergeleitet und als Kurve gegen die Anzahl an bisher durchlaufenen Temperaturzyklen aufgetragen. Exemplarisch wurde ein Light- Cycler- Kurvenverlauf in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 16: Beispielhafter Light- Cycler- Kurvenverlauf für den Nachweis einer Borrelien- infizierten Zecke. Es ist die Fluoreszenz gegen die Anzahl an Temperaturzyklen aufgetragen. Die Kurve der positiven Kontrolle (+) zeigt eine Fluoreszenzvermehrung ab dem 24. Zyklus. Die Kurve der negativen Kontrolle ( $\emptyset$ ) zeigt keine Vermehrung des Fluoreszenzsignales. Die Kurve der Borrelien- infizierten Zeckenprobe (Pp) zeigt eine Zunahme des Fluoreszenzsignals ab dem 32. Zyklus.  
 +: positive Kontrolle,  $\emptyset$ : negative Kontrolle, Pp: positive Zeckenprobe**

### 3.3.2 Statistische Auswertung der Untersuchung auf *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Von den 483 getesteten Zecken wurden 141 positiv auf *B. burgdorferi* s. l. getestet. Dies entspricht einer durchschnittlichen Prävalenz von 29,19 % mit einem 95 %- Konfidenzintervall KI = [25,17; 33,47]. Der Vergleich der Infektionsraten von Nymphen, männlichen und weiblichen Adulten ergab einen signifikanten Unterschied zwischen Nymphen und männlichen Adulten mit einem 95 %- Konfidenzintervall [1,38; 4,09] und einer Odds Ratio OR = 2,36 sowie zwischen Nymphen- Zecken und weiblichen Adulten mit einem 95 %- Konfidenzintervall [1,28; 3,87] und einer Odds Ratio OR = 2,22. Der Vergleich der Infektionsraten zwischen den Geschlechtern zeigte keinen signifikanten Unterschied. Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle von *B. burgdorferi* s. l.- infizierten Zecken, ihren Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechtern sind im Einzelnen in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17: Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle der mit *B. burgdorferi* s. l. infizierten Zecken, ihrer Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechter. (positiv getestete Zecken/Anzahl getesteter Zecken), [Konfidenzintervall], ☆ signifikanter Unterschied**

### 3.3.3 Untersuchung zum Vorkommen der Genospezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Für die Untersuchung des Vorkommens der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. wurden 20 Zecken exemplarisch ausgewählt. Diese waren zuvor positiv auf eine Infestation mit den Erregern getestet worden (siehe Abschnitt 3.2.1). Auf Grund der niedrigen Anzahl getesteter Zecken besitzt die Untersuchung einordnenden Charakter. Die Zecken setzten sich aus zwei Nymphen, elf männlichen sowie sieben weiblichen Adulten zusammen.

Separat untersucht wurde die bereits extrahierte DNA der ausgewählten Zecken mittels einer real-time PCR (siehe Abschnitt 2.2.9.2). Zur Spezifizierung der Amplifikation und der Genotypzuordnung wurde im Anschluss an die Vervielfältigung eine Schmelzkurve angefertigt. Mittels dieser gelang in 19 der 20 untersuchten Borrelienspezies die Bestimmung des Genotyps (siehe Abschnitt 3.3.4). Unter den Borrelienspezies war mit 45 % am häufigsten die Genospezies *B. garinii* vertreten. Weiterhin waren die Genospezies *B. valaisiana* (30%) und *B. afzelii* beziehungsweise *B. burgdorferi* s. s. (20%) nachweisbar. Die genaue Verteilung der Genospezies ist Abbildung 18 zu entnehmen. Auf Grund der kleinen, nicht repräsentativen Stichprobengröße besitzt die Untersuchung einordnenden Charakter. Daher wurden keine statistischen Untersuchungen durchgeführt.



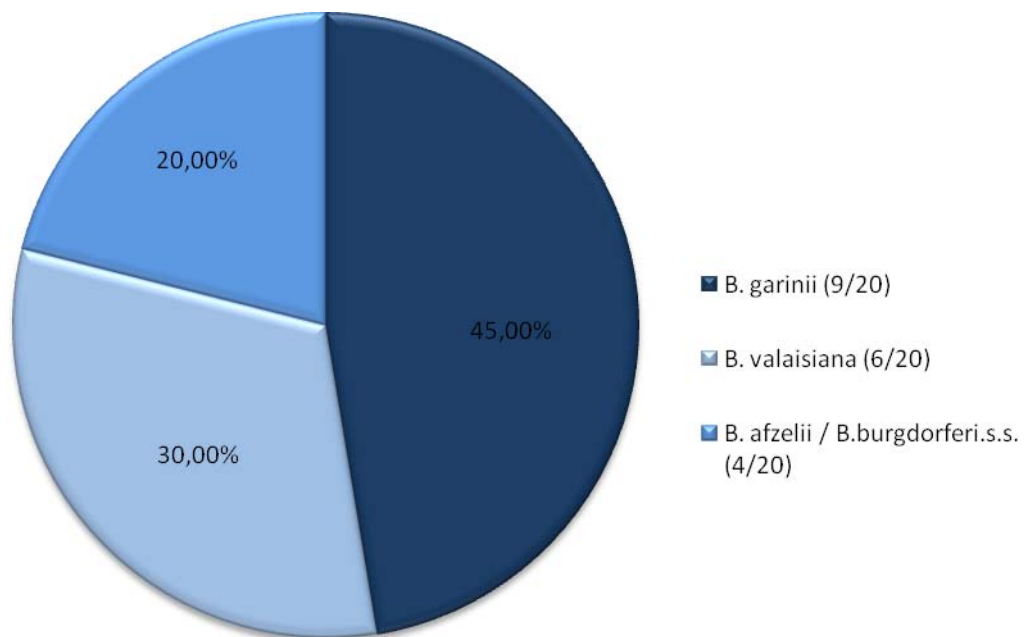


Abbildung 18: Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in der Wingst.

### 3.4 Statistische Auswertung der Untersuchung auf *Anaplasma phagozytophilum* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato im Hinblick auf Koinfektionen

483 Zecken wurden separat auf Infektionen mit *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. untersucht (siehe Abschnitt 2.2.8 und 2.2.9). Von den untersuchten Zecken wurde in 141 Zecken *B. burgdorferi* s. l. und in 29 Zecken *A. phagozytophilum* nachgewiesen. Da jede Zecke separat auf das Vorhandensein von *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* in zwei unterschiedlichen Untersuchungen getestet wurde, konnte eine Aussage über Koinfektionen getroffen werden: Durchschnittlich 1,86 % der Zecken waren mit beiden Bakterien infiziert (95 %- Konfidenzintervall KI = [0,007; 0,062]). Eine genaue Darstellung der Infestationsraten der einzelnen Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechter sind in Abbildung 19 dargestellt.

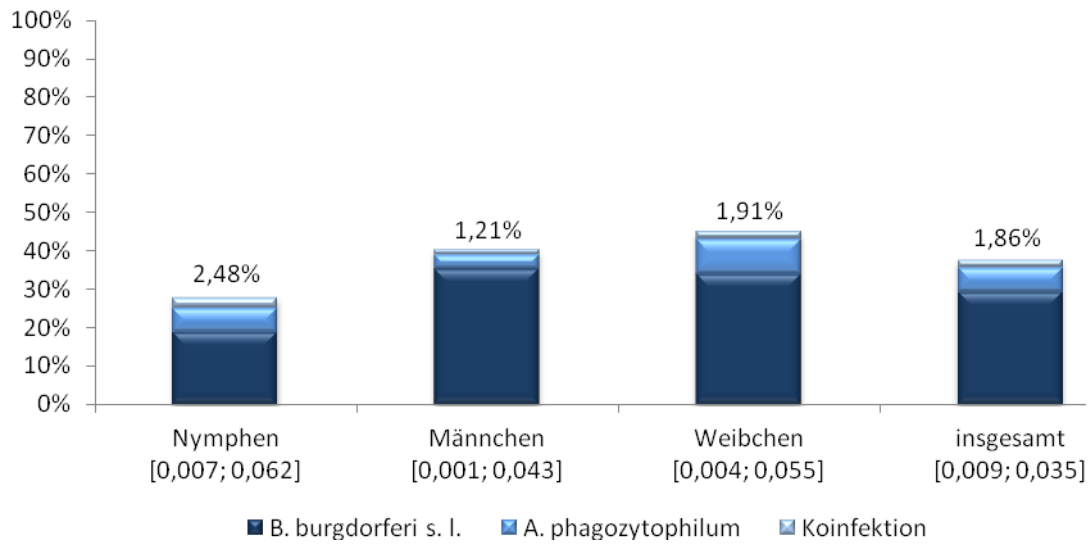


Abbildung 19: Durchschnittliche Prävalenzen und 95 %- Konfidenzintervalle von koinfizierten *I. ricinus*, ihren Entwicklungsstadien beziehungsweise Geschlechtern mit *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. im Vergleich zu den Prävalenzen von Einzelinfektionen mit *A. phagozytophilum* oder *B. burgdorferi* s. l..

## 4 Diskussion

Zur Untersuchung von *I. ricinus* auf das Vorkommen von FSMEV, Borrelien und *A. phagozytophilum* wurden Zecken mittels der Zeckenfahnenfangmethode von der Vegetation in der Region Wingst/Cuxhaven gesammelt und quantitativ erfasst. Der Sammelzeitraum Mai bis Juni und Frühherbst wurde wegen des feucht- warmen Klimas gewählt, da in diesen Tagen die Aktivität der Zecken sehr hoch ist. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden 4.171 Zecken der Art *I. ricinus* untersucht. Weitere Zeckenarten wurden in der Sammelregion nicht gefunden. Die Anzahl gesammelter Zecken und ihrer Entwicklungsstadien war gleichmäßig über die Sammelorte verteilt.

Die zur Zeckensammlung verwendete Zeckenfahnenfangmethode ist eine allgemein gebräuchliche und seit vielen Jahren etablierte Methode. Sie ermöglicht das effektive Sammeln von Nymphen- Zecken, sowie weiblichen und männlichen adulten Zecken vor allem von Gras und Büschen. Allerdings ist die Methode leicht beeinflussbar: So ist das Sammeln interindividuell abhängig vom Sammler und den Wetterverhältnissen. Eine schnell durchfeuchtete Flagge bei regnerischem Wetter verringert die Anzahl an gesammelten Zecken. Wind erschwert die Handhabung der Flagge deutlich. Daher ist eine quantitative Aussage über das Zeckenvorkommen mit dieser Methode nur eingeschränkt möglich (Silaghi 2008).

Die Wingst wurde als Sammel- und Untersuchungsgebiet wegen des Vorkommens von zwei autochthonen FSME- Krankheitsfällen in den Jahren 2004 und 2007 ausgewählt. Auf Grund der Erkrankungsfälle bestand die Annahme, dass FSMEV in der dortige Zeckenpopulation vorhanden sein könnten. Die Wingst als ein mit Mischwäldern bedeckter, dünn besiedelter kleiner Geestrücken ist als Naherholungsgebiet reich frequentiert. Viele der Besucher, unter anderem Kinder und Jugendliche auf Klassenfahrten der örtlichen Jugendherberge, halten sich in der Natur auf. Bei einer möglichen Zeckendurchseuchung könnte ein Risiko sowohl für die Besucher als auch für die Anwohner bestehen.

### 4.1 Untersuchung auf Frühsommermeningoenzephalitis- Viren

Die FSME ist in Europa die bedeutendste, durch Zecken übertragene virale Zoonose. Auch in Teilen Deutschlands kommt das die Krankheit erzeugende Virus endemisch vor (Stark et al. 2009). Als Risikogebiete werden in Deutschland per definitionem solche Gebiete benannt, die eine Inzidenz von mindestens einer Erkrankung auf 100.000 Einwohner besitzen. Niedersachsen und

speziell die Wingst gehören nicht zu den vom RKI definierten Risikogebieten, da die aufgetretenen FSME- Fälle statistisch nicht dafür ausreichen. Dennoch wurden hier vereinzelt autochthone Erkrankungen verzeichnet. Dabei werden FSME- Erkrankungen die in einem Nicht- Risikogebiet verzeichnet wurden, als autochthon bezeichnet. Ob ein Risiko besteht, sich bei Zeckenexposition in einem Gebiet mit FSMEV zu infizieren, ist stark abhängig von der Virusprävalenz in Zecken. Die Untersuchung der FSMEV- Prävalenz in einer Zeckenpopulation ist also gut geeignet, um das Infektionsrisiko abzuschätzen (Danielova et al. 2002). Daher wurde in dieser Arbeit die dortige Zeckenpopulation auf das Vorkommen von FSMEV untersucht.

Für die Untersuchung auf FSMEV wurde eine RT-nested PCR verwendet. Diese Methode wurde gewählt, da sie zum einen eine Detektion mit sehr hoher Sensitivität (minimale Nachweisgrenze 100- 1000 Viren/ml) und Spezifität ermöglicht. Die FSMEV- nachweisende RT- PCR erfasst den westlichen Subtyp. Da die in anderen Studien ermittelten Durchseuchungsraten von Zeckenpopulationen in Risikogebieten mit FSMEV verhältnismäßig gering getestet wurden, musste davon ausgegangen werden, dass in Nicht- Risikogebieten wie Niedersachsen das Verhältnis von infizierten zu nicht- infizierten Zecken noch geringer ausfallen würde (Klaus et al. 2010, Eistetter et al. 1998, Kaiser 2005). Um die daher benötigte große Anzahl an Zecken untersuchen zu können, wurden die Zecken in Pools aufgeteilt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es durch die PCR einen mit FSMEV infizierten Zeckenpool zu detektieren. Dieser Zeckenpool setzte sich aus zehn männlichen adulten Zecken zusammen. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der Amplifikate der Zecken- Probe und der positiven Kontrolle durchgeführt. Die aus der Zeckenprobe extrahierte und amplifizierte Nukleinsäure lag in einer mindestens 10.000fach höheren Konzentration vor als die amplifizierte Nukleinsäure der positiven Kontrolle. Daher konnte eine Verunreinigung der Probe ausgeschlossen und die Viruslast abgeschätzt werden. Weiterhin wurden beide Amplifikate einer Sequenzanalyse unterzogen. Diese gelang vollständig. Beide Nukleotidsequenzen wurden ermittelt. Die Software Blastn ermöglichte den Abgleich der ermittelten Nukleotidabfolgen mit bereits beschriebenen. Er ergab eine Übereinstimmung von 98 % beziehungsweise 99 % mit der FSMEV- Nukleotidsequenz mit der Genbanknummer DQ153877.1. Das Ergebnis der Sequenzanalyse bestätigte das Ergebnis der PCR absolut. Eine Verunreinigung konnte erneut ausgeschlossen werden, da Unterschiede in den Nukleinsäureabfolgen der Zeckenprobe und der PCR- Kontrolle gefunden wurden. Nach der Formel von Abel et al. (1999) wurde die Prävalenz der FSMEV- infizierten *I. ricinus* auf 0,053 % mit einem 95 %- Konfidenzintervall  $KI = [6,86 \times 10^{-6}; 1,51 \times 10^{-3}]$  geschätzt. Die Vermutung einer sehr niedrigen FSMEV- Prävalenz in den Zecken wurde bestätigt; es gelang die Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Es muss geschlussfolgert werden, dass FSMEV in der Zeckenpopulation der

Wingst/Niedersachsen zirkulieren. Da die autochthonen Fälle erst in den letzten Jahren aufgetreten sind, kann eine Neuentstehung des Naturherds postuliert werden. In Untersuchungen von Frimmel et al. aus dem Jahre 2009, die auf Grund autochthoner Erkrankungen in drei verschiedenen Gebieten Mecklenburg- Vorpommerns erfolgten, wurde ebenfalls der Nachweis zirkulierender FSMEV in Nicht- Risikogebieten geführt. Hierbei wurden gesogene und ungesogene Zecken untersucht. Im Unterschied zu der vorliegenden Untersuchung der Region Wingst waren diese Befunde bereits 15 Jahre zuvor schon einmal erbracht worden. In Niedersachsen war der Nachweis von FSMEV erstmals möglich.

Untersuchungen zum Befall von *I. ricinus* mit FSMEV werden bundesweit seit einigen Jahren nicht selten durchgeführt. Dabei ermöglicht der Nachweis von FSMEV mittels PCR einen direkten Erregernachweis. Er ist einfach durchzuführen und zudem sensitiv und spezifisch. Durch den geringen Aktionsradius sowie die relativ geringe Lebenserwartung von Zecken ist eine gute zeitliche und räumliche Einordnung der Durchseuchungssituation möglich (Fomsgaard et al. 2009, Achazi 2011). Der Vergleich bisher erlangter Untersuchungsergebnisse ist leider nur ansatzweise möglich, da die Versuche unter nicht- standardisierten Bedingungen erfolgten. Es ist festzustellen, dass in den Teilen Deutschlands, in denen FSMEV laut der Risikogebiet- Definition des RKI endemisch vorkommen (Bayern, Baden- Württemberg), die größten Zecken- Durchseuchungsraten von bis zu 5,3 % bestehen (siehe Tabelle 25), wobei die Durchseuchung regional sehr unterschiedlich ist. In diesem Zusammenhang wird von sogenannten „hotspots“ gesprochen. Diese lokal begrenzten Gebiete zeichnen sich durch eine hohe Wiederfindungsrate von FSMEV aus. Sie können in direkter Nachbarschaft zu Zeckenpopulationen liegen, in denen keine FSMEV zu finden sind (Oehme 2009). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geschätzte niedrige Prävalenz in einem Nicht- Risikogebiet von 0,053 % ist daher gut mit bisher durchgeführten Untersuchungen vereinbar.

Mit den Ergebnissen der eben genannten Studien vereinbar ist ebenfalls die Tatsache, dass die gefundene infizierte Zecke eine adulte ist. Häufig wird in Nymphen- Zecken eine höhere Prävalenz als in adulten beschrieben. Zusätzliche Blutmahlzeiten adulter Zecken im Vergleich zu früheren Entwicklungsstadien und ein damit verbundenes höheres Infektionsrisiko gilt als mögliche Erklärung.

Jahr der Zeckensammlung	Herkunftsort der Zecken	Nachweisverfahren	Anzahl untersuchter Zecken (Entwicklungsstadium, Geschlechter)	Infestationsrate [%]
1983-1989	neue Bundesländer		8 200 (n.a.)	0
1992	Deutschland	PCR	7 200 (n.a.)	0,03
n.a.	Deutschland	PCR	22 273 (n.a.)	0,04
n.a.	Saarland	PCR	8 780 (n.a.)	0,03
1996	Baden-Württemberg	PCR	1 212 (N) 653 (A)	0,17 0,46
1998-2000	Baden-Württemberg	PCR	9189 (n.a.)	0,0 -2,3
1997- 2002	Bayern/Baden-Württemberg	PCR	18360 (N) 3350 (A)	0- 3,4 0- 5,3
2003	Bayern	PCR	1552 (L,N,A)	< 0,2 %
2007	Mecklenburg-Vorpommern	PCR	250 (N)	2,4 %
2008	Baden-Württemberg	PCR	294 (n.a.)	0

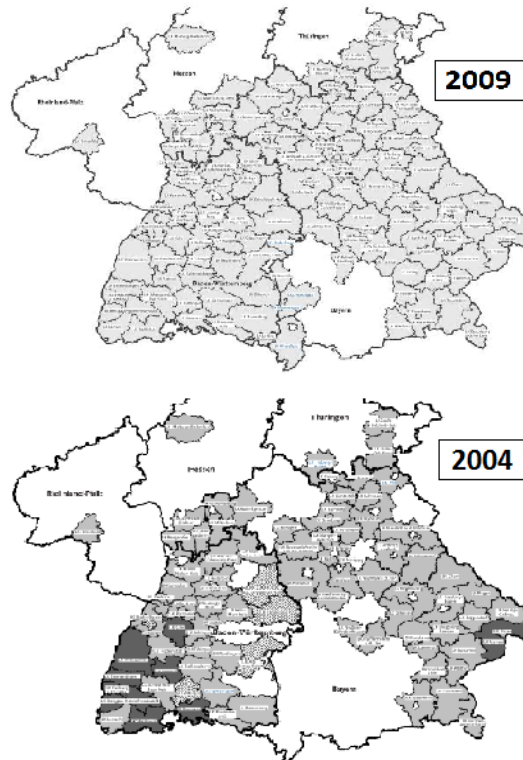
**Tabelle 25: Übersicht über Untersuchungen der Infektionsraten von I. ricinus mit FSMEV in Deutschland (Maier 2003, Kupca 2009, Frimmel et al. 2009, Klaus et al. 2009 a).**

**N = Nyphen- Zecken, A = adulte Zecken; L = Larven- Zecken, n.a. = nicht angegeben**

Besser bekannt als die Durchseuchungsrate der Zecken mit FSMEV ist die Inzidenz und Prävalenz humaner Erkrankungsfälle. Grundlage hierfür ist die seit 2001 bestehende deutschlandweite Meldepflicht für FSME- Erkrankungen. Die Meldepflicht ist standardisiert, besteht bei klinischem und zusätzlichem labordiagnostischen Nachweis, ermöglicht eine präzise Aufzeichnung und macht damit die Einteilung in Risikogebiete möglich. Die Betrachtung der Verteilung der Risikogebiete seit Bestehen der Meldepflicht bis heute lässt erkennen, dass die FSME –wie eben bereits genannt- durchgängig in den südlichen Bundesländern Bayern, Baden- Württemberg und Hessen endemisch auftritt.

Im Gegensatz zu den in Risikogebieten erworbenen Erkrankungen stehen die autochthonen Fälle. Sie wurden in den letzten Jahren ebenso in der Nachbarschaft zur Risikogebieten wie auch in den norddeutschen Bundesländern Niedersachsen und Mecklenburg- Vorpommern beschrieben (Robert Koch- Institut 2009, Frimmel et al. 2009). Das Überschreiten von Grenzwerten der Inzidenzen in Nachbarschaftsregionen zu Risikogebieten wurde häufig verzeichnet. In Folge führt dies bis heute zu Neubenennungen von Risikogebieten und somit zu einer Ausdehnung der Grenzen der Risikogebiete. Diese ist in Hessen nordwärts gerichtet, im Süden Thüringens und flächendeckend in Gesamtbayern und Baden- Württemberg zu verzeichnen. Sie geht aus Abbildung 20 hervor. Niedersachsen und Mecklenburg- Vorpommern liegen nicht in der

Nachbarschaft von Risikogebieten. Dennoch gibt es autochthone FSME- Erkrankungen. In solchen Fällen sollte ein Neuauftreten von Naturherden beziehungsweise die Reaktivierung der endemischen Latenz bedacht werden (Frimmel et al. 2009).



**Abbildung 20: FSME- Risikogebiete 2004 und 2009 im Vergleich (Robert Koch- Institut 2004, Robert Koch- Institut 2009).**

Eine Ausbreitung der Gebiete mit endemischen Vorkommen von FSMEV ist nicht nur in Deutschland, sondern europaweit zu beobachten. So wird in den letzten Jahren immer wieder von neuen Risikogebieten in Europa berichtet. Beispielsweise wurden in Schweden Ende des letzten Jahrhunderts im Südosten und Südwesten autochthone FSME- Erkrankungen verzeichnet. Diese Gebiete sind derweil zu gefestigten Risikogebieten gewachsen (Stjernberg et al. 2008, Brinkley et al. 2008, Fomsgaard et al. 2009). Als ein Aspekt des langen Entwicklungszeitraumes von Risikogebieten ist zu bedenken, dass die Erkrankung des Menschen an FSME zu einem der letzten Schritte in der Infektionskette zählt (Randolph 2008). Die Untersuchung von Csángó et al. aus dem Jahr 2004 stützt diese These: Diese Arbeitsgemeinschaft untersuchte zwischen 1992 und 2000 das Serum von 317 Hunden der südnorwegischen Provinz Aust- Agder, in der FSME bis dato nicht endemisch vorkam. Dennoch konnte eine IgG- Seroprävalenz von 16,4 % in den Tieren ermittelt werden. Erst ab 1998 wurden erste FSME- Erkrankungen des Menschen in diesem Gebiet bekannt. Heute ist Aust- Agder als Risikogebiet ausgewiesen.

Auf der Suche nach der Ursache neu auftretender FSMEV- Foki wurde eine mögliche Einschleppung durch Zugvögel in Betracht gezogen. Untersuchungen zeigten aber, dass Zugvögel kaum Reserviertiere darstellen und somit die Erreger nur über das Mitbringen bereits infizierter Zecken einschleppen können. Eine Untersuchung von Zugvögeln aus Südostschweden im Jahre 2001 belegt, dass weniger als 0,03 % der Tiere FSME- infizierte Zecken trugen. Daher wurde diese Hypothese verworfen (Labuda et al. 1993, Randolph 2008).

Die Ätiologie der Ausdehnung von FSMEV- Endemiegebieten und eine damit verbundene Zunahme von FSME- Erkrankungen ist Gegenstand aktueller Analysen und konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Eine einzelne Ursache konnte nicht gefunden beziehungsweise ausgeschlossen werden. Es wird angenommen, dass die Zunahme multifaktoriell durch biotische, abiotische und sozio- ökonomische Faktoren bedingt ist. Hauptgegenstand der Diskussion ist der Klimawandel (Petri et al. 2010, Kiffner et al. 2010).

Untersuchungen bezüglich des Klimawandels konnten eine Korrelation zwischen dem aufgezeichneten Temperaturanstieg seit den 1980er Jahren und dem Anstieg der FSME- Inzidenz zeigen. Zum einen wird der Zusammenhang durch Vektor- biologische Ursachen wie beschleunigte Entwicklungszyklen, vermehrte Eiablage und eine erhöhte Zeckendichte zu erklären versucht. Zum anderen wurde ein Zusammenspiel des Wetters mit sozio- ökonomischen Faktoren postuliert. Hierbei ist eine erhöhte FSME- Inzidenz auf Grund einer erhöhten Exposition der Menschen beispielsweise durch vermehrten Aufenthalt im Freien im Rahmen vermehrter Freizeitaktivitäten zu erklären (Randolph 2001, Randolph et al. 2008).

Weiterhin kann ein Anstieg der FSME- Inzidenz sowohl durch mangelnde Aufklärung hinsichtlich der FSME und prophylaktischer Maßnahmen zu niedrigen Impfquoten in Endemiegebieten geführt haben. Eine erhöhte öffentlichen Aufmerksamkeit unter medizinischem Personal und bessere diagnostische Möglichkeiten können ebenfalls zu höheren Fallzahlen führen (Randolph 2001, Süss 2008 a).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass unter den oben genannten Gesichtspunkten die Wingst als ein Gebiet mit endemischem Vorkommen von FSMEV zu erklären ist. Ein Infektionsrisiko für Zecken exponierte Personen lässt sich nicht ausschließen. Allerdings ist die Infektionsrate dieser Zeckenpopulation derzeit so gering, dass sie bisher zu keiner signifikanten Steigerung der Inzidenz von FSME- Erkrankungen geführt hat. Aus diesem Grund wurde die Wingst nicht als Risikogebiet im Sinne des RKI ausgewiesen. Daher bleibt die bisherige prophylaktische Empfehlung der STIKO zur Impfung gegen FSME in Niedersachsen unberührt. Gerade weil für die Wingst weiterhin keine Impfpflicht ausgesprochen worden ist, sollte



diese Region in der kommenden Zeit im Blickfeld bleiben. Um das Infektionsrisiko zum Schutz der Bevölkerung beziehungsweise der Urlauber und Waldarbeiter derzeit und in Zukunft besser einschätzen zu können, würde sich eine Ausdehnung der Untersuchung im Sinne noch größerer Zeckenzahlen beziehungsweise größerer serologischer Untersuchungen anbieten. Weiteren Einblick in die Ausbreitung von FSMEV in der Wingst würde die Untersuchung von *I. ricinus*-Wirtstieren wie kleinen Nagetieren erbringen.

Aus weiteren niedersächsischen Gebieten wurden ebenfalls vermehrt autochthone Erkrankungen gemeldet (Monazahian 2011). Untersuchungen dortiger Zeckenpopulationen ähnlich denen der Wingst, würden weiteren Aufschluss über die Ausbreitung von FSMEV geben.

Zudem sollte die Definition für Risikogebiete überdacht werden: Es sollten nicht nur die FSME-Inzidenz, sondern weitere Untersuchungsmethoden wie die Prävalenz von FSMEV in Zecken und deren Wirtstieren beziehungsweise von FSME- Antikörpern in der ansässigen Bevölkerung mitbeurteilt werden. Hierdurch könnten FSME- betroffene Gebiete rechtzeitig erkannt und dementsprechend prophylaktische Maßnahmen ergriffen werden.

## **4.2 Untersuchung zur Prävalenz von Frühsommermeningoenzephalitis-Viren- spezifischen Antikörpern in der Bevölkerung der Wingst**

In Deutschland werden FSME- Risikogebiete durch das RKI ausgewiesen, wenn bei Zeckenexposition in diesen Gebieten das Risiko besteht, an FSME zu erkranken. Ein Risikogebiet ist anhand der Inzidenz von FSME- Erkrankungen definiert. Um das Risiko einer Erkrankung abschätzen zu können, können weitere Parameter verwendet werden. In dieser Arbeit wurde für das Vorhandensein beziehungsweise die Aktivität eines FSMEV- Naturherdes neben der Durchseuchung von *I. ricinus* mit FSMEV die Prävalenz von FSME- Antikörpern in der Bevölkerung gewählt. Hierzu konnten durch die Mithilfe von dortigen Hausärzten Serumproben von 33 Bewohnern der Wingst auf FSME- spezifische IgG- Antikörper untersucht werden. Die Untersuchung erfolgte mittels eines ELISA. Ein von den Probanden ausgefüllter, nicht-anonymisierter Fragebogen wurde zusätzlich genutzt, um eine korrekte Bewertung der Testergebnisse zu ermöglichen. Jeder Proband willigte schriftlich einer Teilnahme an dieser Untersuchung zu.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten bei drei von 33 Probanden Antikörper gegen FSMEV nachgewiesen werden. Diese Immunitätslage muss am ehesten auf eine natürliche Infektion zurückgeführt werden, da eine Impfung offensichtlich nicht vorlag. Bei zwei dieser Fälle kann als

Erklärung für diesen Befund eventuell ein unbemerkter Zeckenstich im Rahmen eines Aufenthaltes in einem FSME- Risikogebiet herangezogen werden. Bei dem dritten Probanden, der sowohl die FSME- Impfung als auch einen Aufenthalt in einem FSME- Risikogebiet verneinte, muss aber anhand der vorliegenden Daten von einer autochthonen, also in Niedersachsen erworbenen FSME- Infektion ausgegangen werden.

Das beschriebene Ergebnis muss allerdings vorsichtig interpretiert werden. Zum einen ist die untersuchte Stichprobe für eine aussagekräftige statistische Untersuchung zu gering. Zum anderen ist zu bedenken, dass die Teilnehmer der Studie nicht zufällig ausgewählt, sondern durch ihren Arztbesuch und durch das Beratungsgespräch mit dem Hausarzt vorselektiert wurden und damit nicht klar repräsentativ für die Bewohner der Wingst sind. Auch die Altersverteilung der Teilnehmer ist durch erstgenannte Selektionierung betroffen und spiegelt nicht die Verteilung der Wingst- Bevölkerung wider.

Hinzu kommt, dass es sich um eine retrospektive Untersuchung handelt. Die im Fragebogen erhobenen Daten können verzerrt worden sein, da es sich um länger zurückliegende Ereignisse handelt. Dieses Phänomen, genannt „Recall-Bias“, kann dazu geführt haben, dass beispielsweise zurückliegende Impfungen oder Aufenthalte in Risikogebieten gegebenenfalls mit Zeckenstichen nicht mehr genau erinnert werden konnten.

FSME- Antikörper- Seroprävalenz- Untersuchungen wurden bereits in speziellen Personengruppen durchgeführt, eine davon in Niedersachsen. In dieser Studie mit Beginn im Jahr 2006 wurden vom Niedersächsischen Landesgesundheitsamt (NLGA) nahezu alle Mitarbeiter (83 %) der Niedersächsischen Landesforsten beziehungsweise der Nordwestdeutschen Forstlichen Versuchsanstalt freiwillig auf FSME- Antikörper untersucht. Ihre Durchführung ist der vorliegenden Arbeit ähnlich und besteht zum einen aus einer Untersuchung der Probandenserum auf IgG- Antikörper gegen FSMEV und zum anderen aus einem Fragebogen bezüglich Berufs-, Reisetätigkeit, Freizeitverhalten, Impfungen, Krankheit, Zeckenstichen und Tierkontakten. Die Auswertung zeigte bei weniger als 35 % der Probanden eine Antikörperbildung, die in 86,5% der Antikörpernachweise auf eine FSME- Impfung zurück zu führen war. Die verbleibenden 13,5% der positiven Befunde wurden im Europäischen Referenzlabor mittels Neutralisationstest nachuntersucht und aufgrund der Neutralisationstiter eher auf eine zurückliegende FSME- Impfung und nicht als eine Immunantwort nach natürlicher Infektion durch FSMEV beurteilt. So gab es bei keinem der Probanden einen Hinweis auf eine autochthon erworbene Infektion (Niedersächsisches Landesgesundheitsamt 2007). Das erste der zweijährlich geplanten Follow-Ups spiegelte das Ergebnis der Erstuntersuchung wider (Monazahian 2009).

Eine weitere Untersuchung zur Seroprävalenz von Antikörpern gegen FSMEV wurde 2008 bei 363 Waldarbeitern in Brandenburg durchgeführt. Bei circa 9 % der Probanden wurden erhöhte Antikörpertiter gefunden. Im Vorfeld der Blutuntersuchung wurden auch in dieser Studie Fragebögen von den Probanden ausgefüllt. Die Fragebögen zielten auf Risikofaktoren für FSME-Infektionen, bisherige FSME- Impfungen, Zeckenbisse und Auslandsaufenthalte ab. Dennoch sollte auch bei dem Ergebnis dieser retrospektiven Untersuchung an recall bias wie nicht mehr erinnerliche, länger zurückliegende FSME- Impfungen, Zeckenbisse oder Aufenthalte in Risikogebieten gedacht werden. Auf interferierende Umstände wie stattgehabte Gelbfieberimpfungen wurde nicht eingegangen (Wohlfahrt et al. 2009).

In einer ähnlichen Studie 2002 von Oehme et al. in Baden- Württemberg wurden Waldarbeiter in Risiko- und nicht- Risikogebieten untersucht. Es wurden die höchsten Antikörperprävalenzen in Gebieten großer FSME- Prävalenzen gefunden. Allerdings konnten Antikörperprävalenzen auch in nicht- Risikogebieten nachgewiesen werden. Alle Studienteilnehmer füllten einen Fragebogen aus. Jedoch wurde nicht nach möglichen, Kreuzreaktionen auslösenden Faktoren wie Gelbfieberimpfungen gefragt. Der Antikörpertiter wurde mittels ELISA untersucht. Das Ergebnis der Studie ist allerdings kritisch zu hinterfragen, da die mittels ELISA positiv getesteten Proben nicht mittels des spezifischeren Neutralisationstest nachuntersucht wurden, sodass eine zu hoch untersuchte Prävalenz angenommen werden kann.

Internationale Studien zu FSME- Antikörper Prävalenzen wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt. In Südostschweden und in Norditalien wurden Gebiete mit einer Winkel ähnlichen Konstellation untersucht, also Gebiete, die bisher als nicht- endemisch für FSME bekannt waren und in denen nun autochthone Fälle bekannt wurden. Sowohl in Italien als auch in Schweden wurden jeweils zwei Gebiete untersucht. 181 Seren italienischer Waldarbeiter beziehungsweise 412 Seren dortiger Bewohner und 200 beziehungsweise 393 Seren schwedischer Bewohner wurden bezüglich der FSME- Antikörperprävalenz mittels ELISA und anschließender Testung der positiv gefundenen Proben mittels Neutralisationstiter untersucht. Bei 0,6 % beziehungsweise keinem der italienischen und 2 % beziehungsweise 0,8 % der schwedischen Probanden wurden Antikörper gefunden (Cinco et al. 2004, Stjernberg et al. 2008, Tomao et al. 2005, Johan et al. 2006). Auf Grund fehlender Standardisierung ist ein Vergleich zwischen den einzelnen Studien nur schwierig möglich. Dennoch ist fast allen Studien der Nachweis von FSME- Antikörpern bei Zecken- exponierten Personen in Gebieten autochthoner FSME- Fälle gemein. In Bezug auf die Antikörperuntersuchung der vorliegenden Arbeit bedeutet dies, dass eine Ausweitung dieser Untersuchung im Sinne einer aussagekräftigen Stichprobe weiteren Aufschluss über das Infektionsrisiko mit FSME geben könnte.

Das Ergebnis sowohl der Seroprävalenz- als auch der Zeckenuntersuchung deutet auf das endemische Vorkommen von FSMEV hin. Auf Grundlage der geltenden Definition von Risikogebieten werden die Risikoeinschätzung für die Region Wingst und damit gegebenenfalls nötige Prophylaxemaßnahmen trotz der vorliegenden Ergebnisse nicht beeinflusst. Eine kritische Betrachtung der Definition von Risikogebieten des RKI ergibt jedoch, dass die FSME- Inzidenz zum einen in Risikogebieten durch die Impfpflicht der STIKO und zum anderen in Gebieten mit niedriger Bevölkerungsdichte wie der Wingst zu niedrig- gemessen am tatsächlichen Infektionsrisiko- angegeben wird (Achazi et al. 2009). Die derzeitige Definition für Risikogebiete gibt keine genaue Aussage über das endemische Vorkommen von FSMEV in Gebieten sehr niedriger Inzidenzen und daher auch nicht über das Infektionsrisiko bei Exposition. Daher sollten zur genauen Einschätzung weitere mögliche Parameter im Sinne von Surrogatmarkern verwendet werden: FSMEV- Prävalenzen in Zecken wie in der vorgelegten Arbeit, humane und tierische und Seroprävalenzen (Klaus et al. 2009 b, Achazi 2011, Fomsgaard et al. 2009). Schlussfolgernd und ausblickend sollten diese Untersuchungen für die Region Wingst und weitere Regionen mit autochthonen Erkrankungen durchgeführt und eine Überarbeitung oder Erweiterung der Definition von Risikogebieten in Betracht gezogen werden. Allerdings wäre eine hieraus gegebenenfalls für die Wingst resultierende Erweiterung der Impfpflicht im Hinblick auf eine Risiko- Nutzen- Abwägung kritisch zu hinterfragen. Weiterhin könnte ausblickend eine Überarbeitung oder Erweiterung der Definition von Risikogebieten in Betracht gezogen werden, da sowohl Untersuchungen zu Antikörpervorkommen der Bevölkerung oder von Wirtstieren als auch Zeckenuntersuchungen näheren Aufschluss über das Infektionsrisiko geben können.

### **4.3 Untersuchung auf *Anaplasma phagozytophilum***

*A. phagozytophilum* ist ein humanpathogenes Bakterium. Durch einen Zeckenstich übertragen verursacht es eine fieberhafte Erkrankung, die mit Kopfschmerzen, Krankheitsgefühl, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie Laborveränderungen einhergeht (Stanek 2009). Die Erkrankung ist allerdings bisher in Deutschland im Gegensatz zum europäischen und amerikanischen Ausland bisher nicht diagnostiziert worden. Aus der Frage heraus, ob die Erreger in hiesigen Zecken nicht zirkulieren oder der Unterschied durch unerkannte Infektionen entsteht, wurden Zecken-exponierte Waldarbeiter auf das Vorkommen spezifischer Antikörper gegen *A. phagozytophilum* untersucht. Bei bis zu 18,4 % von ihnen konnten diese gefunden werden (Baumgarten et al. 2000). Daher ist von einem endemischen Vorkommen von *A. phagozytophilum* auszugehen. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht, um eine Aussage bezüglich in der Wingst zirkulierender Bakterien treffen zu können. In einem solchen Falle würde ein Infektionsrisiko für

Zecken- exponierte Personen bestehen beziehungsweise sollte bei unspezifischen Krankheitszeichen auftretend nach einem Zeckenstich eine HGA mitbedacht werden.

Für die Untersuchung auf *A. phagozytophilum* wurde eine real- time PCR mit der Zielsequenz innerhalb der 16S rRNA auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität verwendet. Die Spezifität konnte durch eingesetzte spezifische Sonden und eine sich anschließende Schmelzkurvenuntersuchung erhöht werden. Die Prävalenz der Erreger in den untersuchten Nymphen- Zecken betrug 6,62 %, die der adulten Weibchen 9,03 % und der adulten Männchen 3,77 %. Im Durchschnitt ist von einer Durchseuchung der Zeckenpopulation mit 6,39 % zu rechnen. Die statistische Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied der Infektionsraten von männlichen beziehungsweise weiblichen Adulten im Gegensatz zu Nymphen- Zecken.

Zur Bestätigung des PCR Ergebnisses wurden stichprobenartig drei der positiv getesteten Zeckenproben einer Sequenzanalyse unterzogen. Zwei der Untersuchungen gelangen. Ein Vergleich der gefundenen Nukleotidabfolge mittels der Software blastn mit bereits publizierten Nukleotidsequenzen ergab eine Übereinstimmung von 94 % beziehungsweise 100 % mit dem 16S rRNA- Genbereich von *A. phagozytophilum* (Genbanknummer HQ630623,1) beziehungsweise mit dem 16S rRNA- Gen einer Ehrlichia spp., zu der auch *A. phagozytophilum* zählt. Somit konnte das PCR- Ergebnis bestätigt werden.

*A. phagozytophilum* ist in Europa weit verbreitet. Der Grad der durchseuchten Zecken variiert stark und liegt zwischen 0,4 % und 66,7 %. 2009 wurden landesweit durchgeführte österreichische Untersuchungen veröffentlicht. Sie zeigten eine Durchseuchung von *I. ricinus* in fast allen Bundesländern von durchschnittlich 14 %. In einem Bundesland waren sogar über 40 % der Zecken infiziert (Stanek 2009). Einen Überblick über einzelne Studien europäischer Länder liefert Tabelle 26. Deutsche Untersuchungen über Infestationsraten von *I. ricinus* mit *A. phagozytophilum* wurden bisher nur vereinzelt durchgeführt. Dabei wurden durchschnittlich zwischen 1,0 % bis 5,4 % infizierte Zecken detektiert. In Süd- und Mitteldeutschland waren durchschnittlich 4,1 % der Zecken infiziert (Fingerle et al. 1999, Hartelt et al. 2004, Hildebrandt et al. 2003 und 2010, Baumgarten et al. 1999, von Loewenich et al. 2003). Auf Grund weltweit nicht- standardisierter Untersuchungsmethoden ist es aber ebenso wie bei Untersuchungen zur Zeckendurchseuchung mit FSMEV schwierig, die einzelnen Ergebnisse zu vergleichen.

Land	Infestationsrate [%] (Publikationsjahr)
England	1,4 – 9 (1998)
Frankreich	1,25 (1998, 1999)
Italien	24,4 (1997, 1998)
Norwegen	6 – 11,5 (1996, 2001)
Österreich	14 % (2009)
Schottland	0,25 – 2 (1998)
Slowenien	3,2 (1999, 2000)
Spanien	0 – 25 (adulte Zecken) 0,4 – 66,7 (Nymphen- Zecken) (1999, 2001)
Schweden	6,6 (1997, 1999)
Schweiz	0,4 – 2,1 (1998, 1999, 2000)
Wales	7 (1998)

**Tabelle 26: Übersicht über Infestationsraten von *I. ricinus* mit *A. phagozytophilum* (Blanco und Oteo 2002, Stanek 2009).**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden etwas höhere Durchseuchungswerte im Vergleich zu anderen Untersuchungen in Deutschland gefunden. Allerdings ist durch die nur vereinzelt durchgeführten Untersuchungen die genaue Durchseuchungssituation unzureichend geklärt. In Niedersachsen wurde erstmals der Nachweis von *A. phagozytophilum* in Zecken im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt. Von besser untersuchten Erregern wie *B. burgdorferi* s. l. in Deutschland oder *A. phagozytophilum* in Österreich sind lokal unterschiedliche Durchseuchungsraten bekannt. Wird ein ähnliches Vorkommen von *A. phagozytophilum* in Deutschland vorausgesetzt, wäre das Ergebnis gut vereinbar und erweitert die Kenntnis lokaler Durchseuchungsraten und somit der Durchseuchungssituation in Deutschland. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das endemische Vorkommen von *A. phagozytophilum* in Zecken der Region Wingst bewiesen.

Das Fehlen von HGA- Erkrankungen trotz Erregernachweis in Deutschland ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Mögliche Unterschiede in der Pathogenität europäischer und amerikanischer Erreger konnten mittels molekularbiologischer Untersuchungen ausgeschlossen werden. Als hauptursächlich wird derzeit der milde und unspezifische Krankheitsverlauf in Kombination mit ärztlicher Unkenntnis bezüglich der Erkrankung und in Folge dessen fehlender Diagnostik angenommen (von Loewenich 2008). Diese Hypothese wirkt vor allem im Hinblick auf seroepidemiologische Untersuchungen zu *A. phagozytophilum* schlüssig, in denen bei 11,4 % bis 18,4 % Zecken- exponierter Waldarbeiter und bei 1,9 % bis 2,6 % nicht- Zecken- exponierter Probanden spezifische Antikörper gefunden wurden, da vorhandene Antikörper auf einen

stattgehabten Kontakt mit *A. phagozytophilum* hinweisen (Baumgarten et al. 2000). Ein ähnliches Geschehen wird bei der humanen Babesiose und humanen Rickettsiosen vermutet (Wölfel et al. 2008, Hildebrandt et al. 2008). Um das Risiko für eine Infektion mit *A. phagozytophilum* besser abschätzen zu können, wären weitere Untersuchungen zum Vorkommen der Bakterien in Zecken wichtig, in Bezug auf die Region Wingst also eine Vergrößerung der Stichprobe sowie bundesweite Untersuchungen. Auf ein gegebenenfalls mögliches Infektionsrisiko sollte die dortige Ärzteschaft hingewiesen werden. Nur so wird es möglich, eine HGA zu bedenken, gegebenenfalls zu diagnostizieren und korrekt zu behandeln.

### ***Candidatus Midichloria mitochondrii***

Der Nachweis von *A. phagozytophilum* wurde mittels einer PCR geführt. Sie bestand aus einer Amplifikation sowie einer anschließenden Schmelzkurvenanalyse. In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich in 43,48 % der Amplifikate ein zusätzlich zu dem *A. phagozytophilum*- nachweisenden oder ein alleiniger Peak bei 53 °C. Da dieser Peak in der verwendeten PCR bisher nicht beschrieben war, stellte sich die Frage, welche Nukleinsäure ihn auslöste. Deshalb wurde eine Sequenzanalyse von fünf der Proben, die ausschließlich einen Peak bei 53 °C zeigten, angeschlossen. Die Sequenzanalyse gelang bei allen Proben. Ein Vergleich der ermittelten Nukleotidabfolgen mit bereits publizierten Abfolgen ergab durchgängig eine bis zu 97 %ige Übereinstimmung mit der des Bakteriums *C. Midichloria m.*

*C. Midichloria m.* ist ein erst seit 2006 benanntes Bakterium, das in die Ordnung der Rickettsiales gehört. Der Symbiont lebt obligat intrazellulär. In weiblichen *I. ricinus* wurde es durch Färbung frei schwimmend im Zytoplasma oder innerhalb der Mitochondrien von Ovarialzellen gefunden. Die Prävalenz dieses symbiontisch lebenden Bakteriums in den weiblichen Zecken betrug 100 %. In männlichen adulten Zecken konnte der Symbiont lediglich mittels PCR detektiert werden. Die Durchseuchung wurde hierbei deutlich geringer mit 44 % angegeben und korrelierte mit einer geringeren Bakterienlast im Vergleich zu den weiblichen Zecken (Sassera et al. 2006 und 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit spiegeln die eben genannten tendenziell wider: Die weiblichen adulten Zecken waren ebenfalls am häufigsten betroffen, allerdings mit einer etwas geringeren Prävalenz von 87 %. Die männlichen adulten Zecken waren mit 43 % häufiger als die Nymphen- Zecken mit etwa 1 % betroffen. Die Frage, ob und wenn ja welches Zusammenspiel zwischen den Zecken, ihren humanpathogenen Erregern sowie *C. Midichloria m.* besteht, bleibt bisher leider weitgehend ungeklärt wie auch die Frage nach human- oder tierpathogenem Wert (Beninati et al. 2009).

Derzeit besteht kein Grund für die Annahme einer Humanpatogenität von *C. Midichloria m.* Im Weiteren sollte eine mögliche Rolle beziehungsweise Interaktion des Bakteriums mit humanpathogenen und von Zecken übertragenen Erregern untersucht werden. Im Anschluss daran wären weitere Untersuchungen zur Prävalenz gegebenenfalls nötig.

#### **4.4 Untersuchung auf *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Die Lyme- Borreliose ist die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung. Die bakterielle Erkrankung wird durch *B. burgdorferi* s. l. hervorgerufen und kommt bundesweit endemisch vor. Da das Risiko an der Lyme- Borreliose zu erkranken unter anderem abhängig von der Zeckendurchseuchung mit dem Erreger ist, wurde die Zeckenpopulation in der Region Wingst auf *B. burgdorferi* s. l. untersucht. Für diese Untersuchung wurde, wie auch schon für die Erfassung von *A. phagozytophilum* eine real- time PCR eingesetzt. Humanpathogene Borrelienspezies sind *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii*. Um die Zugehörigkeit der Borrelien zu ihren Spezies zu analysieren, wurden 20 der bereits positiv auf *B. burgdorferi* s. l. getesteten Zeckenextrakte mittels einer weiteren PCR untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte *B. burgdorferi* s. l. in 29,19 % der 483 getesteten Zecken detektiert werden. Hierbei waren die Nymphen- Zecken mit 18,63 %, die männlichen adulten mit 35,15 % und die weiblichen adulten Zecken mit 33,76 % mit dem Erreger infiziert. Eine statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied der Durchseuchungsraten zwischen Nymphen- und adulten Zecken.

Europa- und deutschlandweit wurden vielzählige Untersuchungen zur Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in Zecken durchgeführt. Über Gesamteuropa verteilt gibt es Regionen, in denen fast jede zweite Zecke mit dem Erreger infiziert ist. Auch in Deutschland wurden bisher vielzählige Untersuchungen zur Prävalenz von Borrelien tragenden Zecken durchgeführt. Durchschnittlich sind knapp 14 % der Zecken durchseucht. Eine Übersicht über bisher durchgeführte Arbeiten liefert Tabelle 27. Die in dieser Arbeit erhobenen durchschnittlichen Prävalenzen liegen im Vergleich etwas höher. Allerdings sind die Borrelien- Prävalenzen in Zecken sehr heterogen. Sie liegen lokal unterschiedlich zwischen 3 bis 49 %. Im Jahr 2007 waren 25 % der Zecken einer südniedersächsischen Population infiziert (Nau et al. 2009). Die Ergebnisse bezüglich der Borrelieninfektion in der vorliegenden Arbeit sind insgesamt mit den eben genannten vereinbar.



Gebiet (Anzahl gesam- melter Zecken)	<i>B. burgdorferi</i> s. l. (N/A) [%]	<i>B. burgdor- feri</i> s. s. [%]	<i>B. gari- nii</i> [%]	<i>B. valais- iana</i> [%]	<i>B. af- zelii</i> [%]	<i>B. lusita- niae</i> [%]	Nicht klassifizier- bar [%]	Mischin- fektionen verschie- dener Borrelien spp. [%]
Bonn (226)	18,1	0	34	12,2	43,9	0	7,3	2,4
Magdeburg (112)	9	10	50	-	40	-	-	-
Thüringen (305)	11,1 (8,6/ 21,0)	20,6	44,1	5,9	17,6	-	-	11,8
Konstanz (1055)	35 %	11	18	-	53	-	1	19,6
Bayern (529)	12,7	11	61	-	25	-		
Siebenge- birge (545)	34	-	23,1	33,8	7,7	-	18,4	16,9
Süd Nieder- sachsen	25 %							

**Tabelle 27: Übersicht über Infektionsraten von *I. ricinus* mit *B. burgdorferi* s. l. (Kurtenbach et al. 2001, Richter et al. 1999, Hildebrandt et al. 2003, Rauter et al. 2002, Fingerle et al. 2004, Ohlenbusch et al. 1996, Kampen et al. 2004, Nau et al. 2009).**

In Europa sind durchschnittlich 10 % aller Nymphen- und 18 % aller adulten Zecken mit Borrelien infiziert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsraten von Nymphen- Zecken im Vergleich zu adulten Zecken wird in der Literatur häufig beschrieben. Ungeachtet dessen, dass die Prävalenzen innerhalb der Zeckenstadien in der vorliegenden Arbeit ebenso wie die zuvor genannten durchschnittlichen Prävalenzen im Vergleich höher liegen, wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Infektionsraten von Nymphen- Zecken im Vergleich zu adulten Zeckenstadien berechnet. Die Adulten zeichnen sich im Gegensatz zu früheren Entwicklungsstadien durch eine zusätzliche Blutmahlzeit aus. Da sich die Zecken selbst durch Blutmahlzeiten infizieren, besteht in höheren Entwicklungsstadien eine größere Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein der Bakterien. Sie werden hauptsächlich transstadiell übertragen. Von nur untergeordneter Bedeutung ist die transovarielle Weitergabe (Rauter und Hartung 2005, Michel 2005).

Die verschiedenen Borrelienspezies stehen im Verdacht unterschiedliche und verschieden stark ausgeprägte Krankheitssymptome hervorzurufen. *B. burgdorferi* s. s. wird mit Arthritiden, *B. afzelii* mit Hautmanifestationen und Acrodermatitis atrophicans und *B. garinii* mit der Neuroborreliose assoziiert. Daher wurde eine Untersuchung zur Zugehörigkeit der Borrelien zu ihren Genotypen abgeschlossen. 45 % der untersuchten Zecken zeigten den Genotyp *B. garinii*, in 30 % beziehungsweise 20 % wurde *B. valaisiana*/*B. afzelii* beziehungsweise *B. burgdorferi* s. s. gefunden. Ähnlich durchgeführte Studien in verschiedenen Gebieten Deutschlands konnten meist

das hauptsächliche Vorkommen von *B. garinii* nachweisen. In einigen Studien war der Subtyp *B. afzelii* am häufigsten vertreten. Die genannten Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle 27 näher dargestellt und mit dem einschätzenden Ergebnis der Studie der vorliegenden Arbeit vereinbar. Um eine statistisch valide Aussage zu treffen, müsste ein größeres Zeckenkollektiv untersucht werden. In weiterer Zusammenarbeit mit den Hausärzten der Wingst könnte sowohl die Lyme-Borreliose- Inzidenz als auch die Verteilung der Borrelien- Genospezies bei den gesogenen Zecken der betreffenden Patienten und eine gegebenenfalls korrelierende Klinik genauer bestimmt werden.

#### 4.5 Koinfektionen

Gelegentlich werden nach Zeckenstichen des Menschen Infektionen mit schweren oder atypischen Verläufen beobachtet. Vor allem dann sollte an eine Erkrankung durch koinfizierte Zecken, also Zecken, die selbst mit mehreren unterschiedlichen Erregern durchseucht sind, gedacht werden, weil nur so eine adäquate Behandlung möglich ist (Loebermann et al. 2006, Hovius et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Nachweis der beiden Bakterien *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. in den einzelnen Zecken separat mittels PCR erbracht. Dadurch, dass jede einzelne Zecke auf beide Erreger untersucht wurde, konnte die Prävalenz von Koinfektionen ermittelt werden. Untersuchungen bezüglich Koinfektionen von Zecken mit *A. phagozytophilum*, *B. burgdorferi* s. l. und weiteren Erregern sind welt- und europaweit bisher nur sehr spärlich durchgeführt worden. In Süd- und Ostdeutschland ermittelte Infektionsraten betragen weniger als 1 %. In der in Ostdeutschland durchgeführten Untersuchung wurden dabei in 11,1 % der Zecken *B. burgdorferi* s. l. und in 2,3 % *A. phagozytophilum* gefunden. Weitere Studienergebnisse sind in Tabelle 28 dargelegt.

Sammelort, -jahr	Koinfektionsprävalenz in Zecken [%]
Thüringen, 2003	0,7
Süddeutschland, 1999	0,80
Süddeutschland, 1999	0,7
Italien, 1997	8,1
Polen, 2002	5,0
Polen, 2009	0,93
Italien, 2005	3,4

**Tabelle 28: Übersicht über die Prävalenz von koinfizierten Ixodes- Zecken mit *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. (Hildebrandt et al. 2003, Swanson et al. 2006, Stanczak et al. 2002, Wójcik- Fatla et al. 2009, Menardi et al. 2008).**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 483 Zecken auf eine Infektion mit *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. untersucht. Durchschnittlich waren 1,86 % (95 %-Konfidenzintervall KI = [0,007; 0,062]) entsprechend 9 von 483 der untersuchten Zecken mit beiden Bakterien gleichzeitig infiziert. Im Vergleich mit den eben genannten Studien liegt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit etwas höher. Allerdings sind die Prävalenzen der Monoinfektionen im Vergleich ebenfalls höher gemessen worden, was eine überdurchschnittlich hohe Prävalenz von Koinfektionen erklärt. Ebenfalls mitbedacht werden sollte, dass die ermittelte Koinfektionsprävalenz unter anderem vom Mikroklima, der Vegetation, der Zeckendichte und der Sammelmethode abhängig ist und zu regional - also zwischen der Region Wingst und dem ostdeutschen Gebiet - unterschiedlichen Prävalenzen führen kann (Swanson et al. 2006, Hildebrandt et al. 2003). Verwunderlich aber ist, warum die Prävalenz von Koinfektionen deutlich geringer ist als die der Monoinfektionen, da in tierexperimentellen Studien festgestellt werden konnte, dass eine Übertragung der einzelnen Erreger bei koinfizierten Zecken nicht vermindert ist (Levin und Fish 2000, Belongia 2002). Niedrigere Prävalenzen koinfizierter Zecken im Vergleich zu monoinfizierten Zecken wiederum erklären, warum humane Erkrankungen meist durch nur einen Erreger ausgelöst werden.

## 5 Zusammenfassung

Die FSME und die Lyme- Borreliose stellen die bedeutendsten, die HGA eine erst in neuerer Zeit durch *I. ricinus* in Europa übertragenen Erkrankungen dar. Die Verbreitung der FSME ist bundesweit gut dokumentiert. Das endemische Vorkommen der FSME ist derzeit auf Mittel- und Süddeutschland beschränkt. Dennoch wurden in den letzten Jahren autochthone Erkrankungsfälle in Norddeutschland, gehäuft in der Region Wingst im Landkreis Cuxhaven verzeichnet. Ziel dieser Arbeit war es, die Zeckenpopulation der Wingst auf das Vorkommen von FSMEV zu überprüfen. Als weiterer Marker für das Vorkommen von FSMEV wurden FSME- spezifische Antikörper bei Bewohnern der Wingst gewählt. In diesem Zusammenhang der Zeckenuntersuchung wurden weitere Zecken auf das Vorkommen von *B. burgdorferi* s. l. und *A. phagozytophilum* analysiert. Diese Untersuchungen waren Bestandteil einer Studie des NLGA, Hannover.

Insgesamt wurden in den Jahren 2008 und 2009 4.171 Zecken in der Region Wingst gesammelt. Die Untersuchung der FSMEV- Prävalenz von 3.688 Nymphen-, männlichen und weiblichen adulten Zecken ergab eine geschätzte durchschnittliche Prävalenz von 0,053 % mit einem 95 %-Konfidenzintervall  $KI = [6,86 \times 10^{-6}; 1,51 \times 10^{-3}]$ . Das mittels RT- PCR erhobene Ergebnis konnte durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals möglich, einen FSMEV- Naturherd in Niedersachsen nachzuweisen.

Für die Untersuchung der Prävalenz FSME- spezifischer Antikörper in der Bevölkerung der Wingst konnten mit Hilfe zweier Hausärzte der Wingst 33 Probanden rekrutiert werden. Diese wurden mittels ELISA auf Antikörper untersucht und durch einen Neutralisationstest bestätigt. Insgesamt muss bei einem der 33 Probanden von einer autochthon erworbenen Infektion ausgegangen werden.

Den Ergebnissen zufolge besteht ein Risiko für Zecken- exponierte Personen in der Wingst. Da allerdings die per definitionem notwendige Inzidenz von mindestens einer Erkrankung auf 100.000 Einwohner innerhalb dieses und der angrenzenden Landkreise statistisch nicht erreicht wurde, folgte keine Deklaration der Wingst als Risikogebiet. Aus diesem Grund haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die Impfpfempfehlung.

Da in den letzten Jahren auch in anderen Gebieten in Niedersachsen vermehrt autochthone FSME- Erkrankungsfälle diagnostiziert wurden, sollte auch dort eine Einschätzung des Infektionsrisikos bei Zeckenexposition durch Untersuchungen der dortigen Zecken erfolgen. Gegebenenfalls ist eine Änderung der Impfpfempfehlung der STIKO zu erwägen.

Für die Untersuchung der Zeckenpopulation auf *A. phagozytophilum* und *B. burgdorferi* s. l. wurde eine weitere, 483 Zecken umfassende Stichprobe verwendet. Jede der Zecken wurde separat sowohl auf *A. phagozytophilum* als auch auf *B. burgdorferi* s. l. untersucht.

Die zur Untersuchung auf *A. phagozytophilum* verwendete PCR detektierte die Bakterien in durchschnittlich 6,39 % der Zecken (95 %- Konfidenzintervall KI = [0,04; 0,09]). Eine Sequenzanalyse der PCR- Amplifikate konnte das Ergebnis bestätigen. Im Rahmen dieser Arbeit war es erstmals möglich, *A. phagozytophilum* in einer niedersächsischen Zeckenpopulation nachzuweisen. Nebenbefundlich konnte in fast 45 % der Zecken der I. ricinus- Symbiont *C. Midichloria m.* verzeichnet werden.

Die Untersuchung von I. ricinus auf *B. burgdorferi* s. l. ergab eine mittlere Prävalenz von 29,19 % (95 %- Konfidenzintervall KI = [0,25; 0,33]). Eine anschließend durchgeführte real- time PCR von 20 der *B. burgdorferi* s. l.- positiv getesteten Zecken ermöglichte eine Zuordnung zu den Genospezies. *B. garinii* war mit 45 % am häufigsten vertreten.

Im Rahmen dieser Arbeit war es zusätzlich zu FSMEV erstmals möglich *A. phagozytophilum* in einer niedersächsischen Zeckenpopulation nachzuweisen. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse sollte bei einer entsprechenden klinischen Symptomatik, gegebenenfalls sogar nach erinnerlichem Zeckenstich immer eine Lyme- Borreliose, eine HGA beziehungsweise FSME in die diagnostischen Überlegungen einbezogen werden. Bei schwerwiegendem oder atypischem Verlauf ist eine Koinfektion mit mehreren Erregern denkbar. Eine Aufklärung der Bevölkerung und des medizinischen Personals kann dazu beitragen erstmals eine HGA zu diagnostizieren und damit korrekt zu behandeln.

## 6 Literatur

Abel U, Schosser R, Suss J (1999): Estimating the prevalence of infectious agents using pooled samples: biometrical considerations. *Zentralbl Bakteriol* 289 (5-7): 550- 563

Achazi K: Identifizierung eines Indikators für die Verbreitung des Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus und Entwicklung einer RNA- Interferenz- Strategie gegen Frühsommer-Meningoenzephalitis. Naturwissenschaftliche Diss. Berlin (2011)

Achazi K, Mantke OD, Nitsche A, Patel P, Paliwal R, Niedrig M: Surrogat marker for tick- borne encephalitis virus in Germany. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrags (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, Programme and Abstracts; o. Hrsg., o. Verl. 2009

Ackermann R (1986): Die Verbreitung der Frühsommermeningoenzephalitis in der Bundesrepublik Deutschland. *Dtsch Med Wochenschr* 111: 927- 933

Alberdi MP, Walker AR, Urquhart KA (2000): Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiol Infect* 124 (2): 315- 323

Alekseev AN, Dubinina HV, Jushkova OV (2004): First report on the coexistence and compatibility of seven tick-borne pathogens in unfed adult *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina: Ixodidae). *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37: 104- 108

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

Balogh Z, Ferenczi E, Szeles K, Stefanoff P, Gut W, Szomor KN, Takacs M, Berencsi G (2009): Die Auswirkungen des Klimawandels, Welche neuen Infektionskrankheiten und gesundheitlichen Probleme sind zu erwarten? *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 52 (7): 699- 714

Barbour AG, Hayes SF (1986): Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50 (4): 381- 400

Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ: Tick- borne encephalitis vaccines; in: *Vaccines*; hrsg. v. Barrett PN, Plotkin SA, Ehrlich HJ; Elsevier Verlag, New York/USA 2008, 841- 856

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

Baumgarten BU, Röllinghoff M, Bogdan C (2000): Ehrlichien. Dtsch Ärztebl 97(38): A2456- 2462

Belongia EA (2002): Epidemiology and impact of coinfections acquired from Ixodes ticks. Vector Borne Zoonotic Dis 2(4): 265- 273

Beninati T, Riegler M, Vilcins IM, Sacchi L, McFadyen RM, Krockenberger M, Bandi C, O'Neill SL, Lo N (2009): Absence of the symbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* in the mitochondria of the tick *Ixodes holocyclus*. FEMS Microbiol Lett 299(2): 241- 247

Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringer A, Elmrud H, Carlsson M, Runehagen A, Svanborg C, Norrby R (1995): An epidemiologic study of Lyme disease in southern Sweden. N Engl J Med 333(20): 1319- 1327

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

Bogovic P, Lotric- Furlan S, Strle F (2010): What tick-borne encephalitis may look like: clinical signs and symptoms. Travel Med Infect Dis 8 (4): 246- 250

Brade V, Hunfeld KP: *Borrelia (B.) burgdorferi*- Komplex; in: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, hrsg. v. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2008, 383- 387

Brinkley C, Nolskogb P, Golovljovac I, Lundkvistc A, Bergström T (2008): Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. Int J Med Microbiol 298 Suppl 1: 73- 80

Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, Brandt WE (1989): Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol 70 (Pt 1): 37- 43

Campbell NA, Reece JB: Biologie. 8. Aktualisierte Auflage; Pearson Studium Verlag, München 2009

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM (1990): Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu Rev Microbiol 44: 649- 688

Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova TV, Gould EA, Gritsun TS, Heinz FX, Labuda (2004): Tick- borne virus diseases of human interest in Europe. Clin Microbiol Infect 10 (12): 1040- 1055

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

Christen HJ, Eiffert H (2003): Lyme-Borreliose, Haut- und Nervensystem. *Monatsschr Kinderheilkd* 151: 1146– 1155

Cinco M, Barbone F, Grazia Ciufolini M, Mascioli M, Anguero Rosenfeld M, Stefanel P, Luzzati R (2004): Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. *Clin Microbiol Infect* 10 (12): 1056- 1061

Clarke DH (1964): Further Studies On Antigenic Relationships Among The Viruses Of The Group B Tick-Borne Complex. *Bull World Health Organ* 31: 45- 56

Csángó PA, Blakstad E, Kirtz GC, Pedersen JE, Czettel B (2004): Tick-borne Encephalitis in Southern Norway. *Emerg Infect Dis* 10 (3): 533- 534

Danielova V, Holubova J, Daniel M (2002): Tick-borne encephalitis virus prevalence in Ixodes ricinus ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic. *Exp Appl Acarol* 26 (1-2): 145- 151

Demaerschack I, Ben Messaoud A, De Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E (1995): Simultaneous presence of different Borrelia burgdorferi genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 33 (3): 602- 608

Demma LJ, Holman RC, McQuiston JH, Krebs JW, Swerdlow DL (2005): Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002. *Am J Trop Med Hyg* 73 (2): 400- 409

Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Frühsommermeningoenzephalitis, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008 a

Deutsche Gesellschaft für Neurologie: Neuroborreliose, Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 4. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008 b

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR (2001): Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of



Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int J Syst Evol Microbiol 51 (Pt 6): 2145- 2165

Dumler JS, Choi KS, Garcia- Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS (2005): Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum. Emerg Infect Dis 11 (12): 1828- 1834

Ecker M, Allison SL, Meixner T, Heinz FX (1999): Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J Gen Virol 80 (Pt 1): 179- 185

Eckert J, Friedhoff KT, Zahner H, Deplazes P: Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2. vollständig überarbeitete Auflage; Enke Verlag, Stuttgart 2008

Edigkauer M, Gniel D (2005): FSME in Europa - ein weit verbreitetes Problem. ImpfDialog 2: 61- 64

Eistetter S, Kimmig P, Oehme R (1998): Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME in Baden-Württemberg. Bundesgesundheitsblatt 98 (2): 62- 66

Falke D: Flaviviren; in: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; hrsg. v. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF , Suerbaum S; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2009, 477- 482

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

Fingerle V, Michel H, Hettche G, Hizo-Teufel C, Wilske B (2004): Borrelia burgdorferi s. l. OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. Int J Med Microbiol 293 Suppl 37: 165- 166

Fomsgaard A, Christiansen CB, Bocker R (2009): First identification of tick-borne encephalitis in Denmark outside of Bornholm, August 2009. Euro Surveill 14 (36): 1- 2

Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süß J, Reisinger EC: Tick- borne encephalitis (TBE) virus in ticks in north- eastern Germany- first detection after 15 years. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrags (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, Programme and Abstracts; o. Hrsg., o. Verl. 2009

Gern L, Estrada- Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA (1998): European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zentralbl Bakteriol 287 (3): 196- 204

Gray JS (1998): The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. Exp Appl Acarol 22 (1998) 249- 258

Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P (2004): Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (Ehrlichia sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int J Med Microbiol 293 Suppl 37: 86- 92

Hayes EB, Piesman J (2003): How can we prevent Lyme disease? N Engl J Med 348 (24): 2424- 2430

Hayes SF, Burgdorfer W, Aeschlimann A (1980): Sexual transmission of spotted fever group rickettsiae by infected male ticks: detection of rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. Infect Immun 27 (2): 638- 642

Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C, Harris BA, Rey F, Harrison SC (1991): The flavivirus envelope protein E: isolation of a soluble form from tick-borne encephalitis virus and its crystallization. J Virol 65 (10): 5579- 5583

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR, Houghton M, Moormann RJ, Rice CM, Thiel HJ: Family Flaviviridae; in: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses; hrsg. v. Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB; Academic Press, San Diego 2000, 859- 878

Hildebrandt A: Prävalenz von Ehrlichien der Ehrlichia phagocytophila Genogruppe und Borrelien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes in *Ixodes ricinus* Zecken aus dem Ilmtal. Med. Diss. Jena 2002

Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Straube E, Fingerle V (2003): Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 22 (6): 364- 367

Hildebrandt A, Tenter AM, Straube E, Hunfeld KP (2008): Human babesiosis in Germany: Just overlooked or truly new? Int J Med Microbiol 298, 336- 346

- Hildebrandt A, Krämer A, Sachse S, Straube E (2010): Detection of *Rickettsia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in a region of Middle Germany (Thuringia). *Ticks Tick-borne Dis* 1 (1): 52- 56
- Hillyard PD: The Ticks of North- West Europe, in: Synopses of the British Fauna, Band 52; hrsg. v. Barnes RSK, Crothers JH; The Dorset Press, Dorchester/Großbritannien 1996,
- Holzmann H (2003): Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21 Suppl 1: 36- 40
- Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, Netzer M, Koppi S, Bechter E, Heinz FX (2009): Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis* 15 (10): 1671- 1673
- Horst H: Entdeckungsgeschichte der Lyme- Krankheit und des Erregers *Borrelia burgdorferi*, in: Zeckenborreliose, Lyme- Krankheit bei Mensch und Tier; hrsg. v. Horst H; Spitta- Verlag, Balingen 2003, 15- 31
- Hovius JW, Li X, Ramamoorthi N, van Dam AP, Barthold SW, van der Poll T, Speelman P, Fikrig E (2007): Coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49 (2): 224- 234
- Hua CM, Cheminade Y, Perret JL, Weynants V, Lobet Y, Gern L (2003): Early detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Balb/c mice by co-feeding *Ixodes ricinus* ticks. *Int J Med Microbiol* 293 (6): 421- 426
- Hubalek Z (2009): Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 31- 50
- Huppertz HI (1999): Incidence of Lyme- Borreliosis in the Würzburg Region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 697– 703
- Inokuma H, Oyamada M, Kelly PJ, Jacobson LA, Fournier PE, Itamoto K, Okuda M, Brouqui P (2005): Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. *J Clin Microbiol* 43 (6): 2934- 2937
- Janitza- Futterer D: Serologische Untersuchungen zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME- Virus in einer südbadischen Pferde- und Hundepopulation. *Vet. Med. Diss. Berlin* 2003
- Johan F, Asa L, Rolf A, Barbro C, Ingvar E, Mats H, Ake L, Sirkka V, Bo S (2006): Tick-borne encephalitis (TBE) in Skane, southern Sweden: A new TBE endemic region? *Scand J Infect Dis* 38: 800- 804

Kaiser R (1999): The clinical and epidemiological profile of tick- borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 122 (Pt 11): 2067- 2078

Kaiser R (2005): Neuroborreliose und Frühsommer–Meningoenzephalitis, Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Fortschr Neurol Psychiatr* 73(12): 750- 764

Kaiser R: Clinical description; in: Monograph - Tick- borne Encephalitis (TBE, FSME), hrsg. v. Baxter AG, o. Verl., Wien 2007, 21- 28

Kampen H, Rotzel DC, Kurtenbach K, Maier WA, Seitz HM (2004): Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* 70 (3): 1576- 1582

Kiffner C, Zucchini W, Schomaker P, Vor T, Hagedorn P, Niedrig M, Rühle F (2010): Determinants of tick- borne encephalitis in counties of southern Germany, 2001- 2008. *Int J Health Geogr* 9 (42), 1- 10

Klaus C, Bauer K, Hoffmann B, Beer M, Müller W, Stark B, Bader W, Heinz FX, Süss J: Seroprevalence of tick- borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrags (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, Programme and Abstracts; o. Hrsg., o. Verl. 2009 a

Klaus C, Bauer K, Hoffmann B, Beer M, Müller W, Stark B, Bader W, Miller T, Moog U, Schau U, Saier R, Heinz FX, Süss J: Virus prevalence in ticks and seroprevalence in animals- could it be helpful for tick- borne encephalitis (TBE) risk definition?. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrags (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, Programme and Abstracts; o. Hrsg., o. Verl. 2009 b

Klaus C, Hoffmann B, Hering U, Mielke B, Sachse K, Beer M, Süss J (2010): Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. *Clin Microbiol Infect* 16: 238- 244

Korenberg E (1999): Relationships between the agents of transmissible diseases in mix-infected ixodid ticks. *Parazitologiya* 32: 273- 289

- Kowalski J, Hopfenmuller W, Fingerle V, Malberg H, Eisenblätter M, Wagner J, Miksits K, Hahn H, Ignatius R (2006): Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect* 12(9): 924- 927
- Kunze M: Therapy; in: Monograph - Tick- borne Encephalitis (TBE, FSME), hrsg. v. Baxter AG, o. Verl., Wien 2007, 29
- Kupca AM: *Ixodes ricinus* (Ixodidae): Saisonale Aktivität und natürliche Infektionen mit dem FSME-Virus an ausgewählten Standorten in Bayern. *Vet. Med. Diss. München* 2009
- Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schafer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincova K, Labuda M (2001): Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* 67 (10): 4926-4929
- Labuda M, Nuttall PA, Kozuch O, Eleckova E, Williams T, Zuffova E, Sabo A (1993): Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49 (9): 802- 805
- Levin ML, Fish D (2000): Acquisition of Coinfection and Simultaneous Transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* Ticks. *Infect Immun* 68 (4): 2183-2186
- Liebisch A, Liebisch G: Biologie und Ökologie der Zecken; in: Zeckenborreliose, Lyme- Krankheit bei Mensch und Tier; hrsg. v. Horst H; Spitta- Verlag, Balingen 2003, 32- 48
- Lin M, Rikihisa Y (2003): *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect Immun* 71 (9): 5324- 5331
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM: Flaviviridae: The Viruses and Their Replication; in: *Fields Virology*; hrsg. v. Knipe DM, Howley PM u.a.; Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia/USA 2007, 1101- 1153
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M (2000): PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol* 38 (3): 1002- 1007
- Loebermann M, Fingerle V, Lademann M, Fritzsche c, Reisinger EC (2006): *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* coinfection. *Emerg Infect Dis* 12 (2): 353- 355

Maier WA (2003): Mögliche Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die Ausbreitung von primär humanmedizinisch relevanten Krankheitserregern über tierische Vektoren sowie auf die wichtigen Humanparasiten in Deutschland. Bundesministerium für Umwelt, Umweltbundesamt, Forschungsbericht 200 61 218/11: 88- 113

Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T (2009): Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. J Gen Virol 90 (Pt 8): 1781- 1794

Martini E: Lehrbuch der medizinischen Entomologie. 3. Auflage; Verlag von Gustav Fischer, Hamburg 1946

Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Int J Syst Evol Microbiol 51 (Pt 5): 1817- 1824

Menardi G, Floris R, Mignozzi K, Boemo B, Altobelli A, Cinco M (2008): Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* in the trans- border area between Italy and Slovenia and evaluation of co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in ticks. Int J Med Microbiol 298 Suppl 1: 121- 124

Messerer S: Entwicklung und Evaluierung von real- time PCR- Verfahren zum Nachweis von *Ehrlichia canis* und *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmataceae). Vet. med. Diss. München 2006

Michel H: Entwicklung und Evaluierung molekularbiologischer Nachweismethoden zur Spezies- und OspA-Typ-Differenzierung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Med. Diss. Heidelberg 2005

Mickiene A: Diagnosis; in: Monograph - Tick- borne Encephalitis (TBE, FSME), hrsg. v. Baxter AG, o. Verl., Wien 2007, 29- 31

Modrow S, Falke D, Truyen U: Flaviviren, in: Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin 2010, 196- 213

Monazahian M: Persönliche Mitteilung, Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover 2009

Monazahian M: Zecken, Mäuse und Mücken: Neue Gesundheitsrisiken durch den Klimawandel? FSME- Erkrankungen in Niedersachsen. Zitiert nach Vortrag (gehalten 15. 11. 2010) in: November der WISSENSchaf(f)t, Hannover, 29. 10. bis 21. 11. 2010; Initiative Wissenschaft, o. Verl. 2010

Monazahian M: Persönliche Mitteilung, Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, Hannover 2011

Monazahian M, Beyrer K, Baillot A, Brakensiek K: FSME- und Echinococcus- Screening bei niedersächsischen Forstbediensteten 2008/09 – Zweiter Durchlauf; in: Jahresbericht 2008/2009, hrsg. v. Niedersächsisches Landesgesundheitsamt; o. Verl., Hannover 2010, 145- 148

Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009

Müller- Esterl W: Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 1. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2004

Nau R, Christen HJ, Eiffert H (2009): Lyme Disease- Current State of Knowledge. Dtsch Arztebl Int 106 (5): 72– 82

Nava S, Guglielmo AA, Mangold AJ (2009): An overview of systematics and evolution of ticks. Front Biosci 1 (14): 2857- 2877

Niedersächsisches Landesgesundheitsamt (2007): Seroprävalenzstudie zu FSME und Echinokokkose bei niedersächsischen Forstbediensteten: Bericht zur ersten Untersuchungsphase. Inf Hyg 2007 (6), 1- 16

Oehme R: Persönliche Mitteilung, Landesgesundheitsamt Baden- Württemberg, Stuttgart 2009

Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P (2002): Foci of tick- borne diseases in southwest Germany. Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 22- 29

Ohlenbusch A, Matuschka FR, Richter D, Christen HJ, Thomssen R, Spielman A, Eiffert H (1996): Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. J Infect Dis 174 (2): 421- 423

Owen DC (2006): Is Lyme disease always poly microbial?--The jigsaw hypothesis. Med Hypotheses 67 (4): 860- 864

Park JH, Heo EJ, Choi KS, Dumler JS, Chae JS (2003): Detection of antibodies to Anaplasma phagocytophilum and Ehrlichia chaffeensis antigens in sera of Korean patients by western immunoblotting and indirect immunofluorescence assays. Clin Diagn Lab Immunol 10 (6): 1059- 1064

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

Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D (2000): Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94 (6): 707- 708

Paster BJ, Dewhirst FE (2000): Phylogenetic foundation of spirochetes. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2 (4): 341- 344

Petri E, Gniel D, Zent O (2010): Tick-borne encephalitis (TBE) trends in epidemiology and current and future management. *Travel Med Infect Dis* 8 (4): 233- 245

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

Pietila J, He Q, Oksi J, Viljanen MK (2000): Rapid differentiation of *Borrelia garinii* from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by Light Cycler fluorescence melting curve analysis of a PCR product of the recA gene. *J Clin Microbiol* 38 (7): 2756- 2759

Plettenberg A, Mohrmann G, Stoehr A, Meyer T (2007): Borreliose und andere durch Zecken übertragene Infektionen – Ein Update. *Hamburger Ärztebl* 2007 (7-8): 356- 361

Postic D, Garnier M, Baranton G (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol* 297 (4): 263- 271

Puchhammer- Stöckl E, Kunz C, Mandl CW, Heinz FX (1995): Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. *Clin Diagn Virol* 4 (4): 321- 326

Randolph SE (2001): The shifting landscape of tick- borne zoonoses: tick- borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. *Phil Trans R Soc Lond* 2001 (356): 1045- 1056

Randolph SE (2008): Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. *Curr Opin Infect Dis* 21 (5): 462- 467

Randolph SE, Asokliene L, Avsik- Zupanc T, Bormane A, Burri C, Gern L, Golovljova I, Hubalek Z, Knap N, Kondrusik M, Kupca A, Pejcoch M, Vasilenko V, Zygtiene M (2008): Variable Spikes in tick- borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. *Parasit Vectors* 1 (1): 44



- Rauter C, Hartung T (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. Appl Environ Microbiol 71 (11): 7203- 7216
- Rauter C, Oehme R, Diterich I, Engele M, Hartung T (2002): Distribution of clinically relevant Borrelia genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real- time PCR. J Clin Microbiol 40 (1): 36- 43
- Richter D, Endepols S, Ohlenbusch A, Eiffert H, Spielman A, Matuschka FR (1999): Genospecies diversity of Lyme disease spirochetes in rodent reservoirs. Emerg Infect Dis 5 (2): 291- 296
- Richter D, Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G (2006): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 56 (Pt 4): 873- 881
- Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF (1997): Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. Clin Microbiol Infect 3 (1): 109- 116
- Rikihisa Y (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin Microbiol Rev 4 (3): 286- 308
- Robert Koch- Institut (1998): Verbreitung der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland und Schlußfolgerungen für die Prävention. Epidemiol Bull 1998 (27): 193- 195
- Robert Koch- Institut (2001): Risikogebiete der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos in Deutschland ermöglicht gezielte Prävention für Exponierte. Epidemiol Bull 2001 (16): 105- 109
- Robert Koch- Institut (2002): Risikogebiete der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos in Deutschland ermöglicht gezielte Prävention für Exponierte. Epidemiol Bull 2002 (26): 212- 218
- Robert Koch- Institut (2003): FSME: Risikogebiete in Deutschland Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. Epidemiol Bull 2003 (20): 165- 172
- Robert Koch- Institut (2004): Risikogebiete der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos ermöglicht gezielte Prävention. Epidemiol Bull 2004 (21): 169- 176

Robert Koch- Institut (2005): FSME: Risikogebiete in Deutschland, Zum örtlichen Erkrankungsrisiko der Frühsommer-Meningoenzephalitis und zu Schlussfolgerungen für präventive Maßnahmen. Epidemiol Bull 2005 (16): 137- 145

Robert Koch- Institut (2006): FSME: Zum aktuellen Vorkommen in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos – Karte der Risikogebiete. Epidemiol Bull 2006 (17): 129- 136

Robert Koch- Institut (2007 a): Lyme-Borreliose, RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte, [http://www.rki.de/cIn\\_160/nn\\_466802/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_\\_Mbl\\_\\_LymeBorreliose.html#doc208628bodyText1](http://www.rki.de/cIn_160/nn_466802/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber__Mbl__LymeBorreliose.html#doc208628bodyText1), 21. 11. 2009

Robert Koch- Institut (2007 b): Lyme- Borreliose: Zur Situation in den östlichen Bundesländern, Analyse der Meldedaten aus dem 5- Jahrzeitraum von 2002 bis 2006. Epidemiol Bull 2007 (38): 352- 355

Robert Koch- Institut (2007 c): FSME: Risikogebiete in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos – Karte der Risikogebiete. Epidemiol Bull 2007 (15): 129- 135

Robert Koch- Institut (2008): FSME: Risikogebiete in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos – Karte der Risikogebiete. Epidemiol Bull 2008 (17): 134- 140

Robert Koch- Institut (2009): FSME: Risikogebiete in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. Epidemiol Bull 2009 (18): 165- 176

Robert Koch- Institut (2010): FSME: Risikogebiete in Deutschland, Bewertung des örtlichen Erkrankungsrisikos. Epidemiol Bull 2010 (17): 147- 155

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH (2009 a): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. J Clin Microbiol 47 (1): 134- 141

Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH (2009 b): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp.nov.. J Clin Microbiol 47 (12): 3875- 3880

Sassera D, Beninati T, Bandi C, Bouman EA, Sacchi L, Fabbi M, Lo N (2006): '*Candidatus Midichloria mitochondrii*', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. Int J Syst Evol Microbiol 56 (Pt 11): 2535- 2540

Sassera D, Lo N, Bouman EA, Epis S, Mortarino M, Bandi C (2008): Candidatus Midichloria endosymbionts bloom after the blood meal of the host, the hard tick Ixodes ricinus. Appl Environ Microbiol 74 (19): 6138- 6140

Schaarschmidt- Kiener D: Persönliche Mitteilung, Labor Alomed, Radolfzell-Böhringen 2008

Schaarschmidt- Kiener D, Müller W (2007): Labordiagnostische und klinische Aspekte der kaninen Anaplasrose und Ehrlichiose. Tierärztl Prax 35 (2) 129- 136

Silaghi CHA: Prevalence and genetic analysis of Anaplasma phagocytophilum and spotted fever group rickettsiae in the tick Ixodes ricinus in urban and periurban sites in Southern Germany. Vet. med. Diss. München 2008

Skotarczak B (2009): Adaption factors of Borrelia for host and vector. Ann Agric Environ Med 16, 1- 8

Sonenshine DE: Biology of Ticks. 1. Auflage; Oxford University Press, New York 1991

Sonenshine DE: Ticks; in: Encyclopedia of Insects; hrsg. v. Resh VH, Cardé RT; Elsevier Science San Diego/USA 2003, 1132- 1141

Sparagano OA, Allsopp MT, Mank RA, Rijpkema SG, Figueroa JV, Jongejan F (1999): Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): a review. Exp Appl Acarol 23 (12): 929- 960

Stańczak J, Racewicz M, Kruminis- Lozowska W, Kubica- Biernat B (2002): Coinfection of Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). Int J Med Microbiol 291 Suppl 33: 198- 201

Stanek G (2009): Büchse der Pandora: Krankheitserreger in Ixodes ricinus-Zecken in Mitteleuropa. Wien Klin Wochenschr 121 (21- 22): 673- 683

Stanek G, Burger I, Hirschl A, Wewalka G, Radda A (1986): Borrelia transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 263 (1-2): 29- 33

Stark K, Niedrig M, Biederbic W, Merkert H, Hacker J (2009): Die Auswirkungen des Klimawandels, Welche neuen Infektionskrankheiten und gesundheitlichen Probleme sind zu erwarten? Bundesgesundheitsblatt- Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz 52 (7): 699- 714

Stjernberg L, Holmkvist K, Berglund J (2008): A newly detected tick-borne encephalitis (TBE) focus in south-east Sweden: a follow-up study of TBE virus (TBEV) seroprevalence. *Scand J Infect Dis* 40 (1): 4- 10

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

Süss J: Zecken- Was man über FSME und Borreliose wissen muss. Heinrich Hugendubel Verlag, München 2008 a

Süss J (2008 b): Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13 (26): 1- 8

Süss J, Schrader C (2004): Durch Zecken übertragene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa, Teil 1: Zecken und Viren. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung- Gesundheitsschutz* 2004, 47: 392- 404

Süss J, Klaus C, Gerstengarbe FW, Werner PC (2008): What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med* 15 (1): 39- 45

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

Telford SR 3rd, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH (1996): Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (12): 6209- 6214

Thiemann F: Molekularbiologische Diagnostik, Band1. MTAPraxis Hoppenstedt Publishing, Darmstadt 2002

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

Tomao P, Ciceroni L, D'Ovidio MC, De Rosa M, Vonesch N, Iavicoli S, Signorini S, Ciarrocchi S, Ciufolini MG, Fiorentini C, Papaleo B (2005): Prevalence and incidence of antibodies to Borrelia burgdorferi and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 (7): 457- 463

Von Loewenich FD: Das unbemerkte Bakterium. [http://www.bio-pro.de/de/region/freiburg/magazin/05195/index.html?lang=de&&print\\_style=yes](http://www.bio-pro.de/de/region/freiburg/magazin/05195/index.html?lang=de&&print_style=yes), 12. 09. 2008

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

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

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (4): 506- 513

Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12 (4): 633- 653

Weber R, Pusterla N, Loy M, Leutenegger CM, Schär G, Baumann D, Wolfensberger C, Lutz H (2000): Serologische und klinische Daten weisen auf das endemische Vorkommen der humanen granulozytären Ehrlichiose in der Nordostschweiz hin. *Schweizer Med Wochenschr* 130 (41): 1462- 1470

Wilske B, Barbour AG, Bergstrom S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R (1992): Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res Microbiol* 143 (6): 583- 596

Wilske B, Preac- Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993): An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 31 (2): 340- 350

Wilske B, Busch U, Eiffert H, Fingerle V, Pfister HW, Rossler D, Preac- Mursic V (1996): Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol* 184 (4): 195- 201

Wirtz H.-P (2001): Zecken als Krankheitsüberträger, was tun bei einem Stich? *Biologie in unserer Zeit* 31 (4): 229- 238

Wölfel R, Essbauer S, Dobler G (2008): Diagnostics of tick- borne rickettsioses in Germany: A modern concept for a neglect disease. *Int J Med Microbiol* 298 Suppl 1: 368- 374

Wohlfahrt K, Niederstraßer O, Dobler G, Mertens M, Ulrich RG, Donoso- Mantke O, Niedrig M, Werdermann S, Petri E: Seroprevalence for tick- borne encephalitis virus (TBEV) in forestry

workers in the federal state of Brandenburg, Germany. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrags (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, Programme and Abstracts; o. Hrsg., o. Verl. 2009

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

Woldehiwet Z (2009): The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 167 (2-4): 108- 122

Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klempner MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G (2006): The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 43 (9): 1089- 1134

## 7 Anhang: Fragebogen zur Untersuchung der Prävalenz von Antikörpern gegen Frühsommermeningoenzephalitis- Viren in der Bevölkerung der Wingst

### Einsendeschein • Begleitschein



Niedersächsisches Landesgesundheitsamt  
Roesebeckstraße 4-6 • 30449 Hannover

Labor-Nr. 1	Labor-Nr. 2	Labor-Nr. 3	Labor-Nr. 4	Labor-Nr. 5
-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

<b>Einsender</b>	<b>Teilnehmer/in</b> bitte deutlich schreiben
Name	Name
Straße	Vorname
PLZ Ort	Straße
Ansprechpartner	PLZ Ort
☎	Geb.-Datum
	Geschlecht <input type="checkbox"/> männlich <input type="checkbox"/> weiblich

### Screening Programm Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) (Landkreis Cuxhaven - Wingst)

#### Ärztliche Angaben

Datum der Blutentnahme: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Besteht derzeit bei dem Teilnehmer ein **Verdacht auf bzw. berichtet er/sie über ...**

	Ja	Nein	welcher Art ?
a) einen akuten Infekt?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
b) eine durch Zecken übertragene Erkrankung?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift der/des einsendenden Ärztin/ Arztes

#### Einwilligungserklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,

Bitte unterzeichnen Sie die nachfolgende Einwilligungserklärung, **ohne die eine Durchführung der Untersuchungen nicht möglich ist.**

- Hiermit willige ich in die unentgeltliche Blutuntersuchung zur Bestimmung von Antikörpern gegen das FSME-Virus ein und bin mit der Einlagerung (Einfrieren) des Blutserums für Kontrolluntersuchungen bis zum Abschluss der Studie einverstanden. Das Ergebnis bespricht der o.g. Arzt mit mir.
- Ich wurde von dem Arzt/Ärztin ..... über die Risiken der Blutentnahme entsprechend aufgeklärt und entbinde ihn/sie, gegenüber dem Niedersächsischen Landesgesundheitsamt von seiner/ihrer ärztlichen Schweigepflicht für die im Einsendeschein „Screening Programm Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)“ zu machenden Angaben.
- Ich bin damit einverstanden, dass das Niedersächsische Landesgesundheitsamt unter Beachtung der Datenschutz- und Datensicherungsvorschriften meine Angaben aus dem „Fragebogen zum Screening Programm Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)“ zusammen mit den Laborergebnissen auswertet.
- Das Informationsblatt zur Studie habe ich erhalten und gelesen. Die Erläuterungen zu den jeweiligen Ergebnissen der Blutuntersuchung habe ich zur Kenntnis genommen. Ich habe keine weiteren Fragen zu Zweck und Durchführung der Studie.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

**Bitte wenden!**

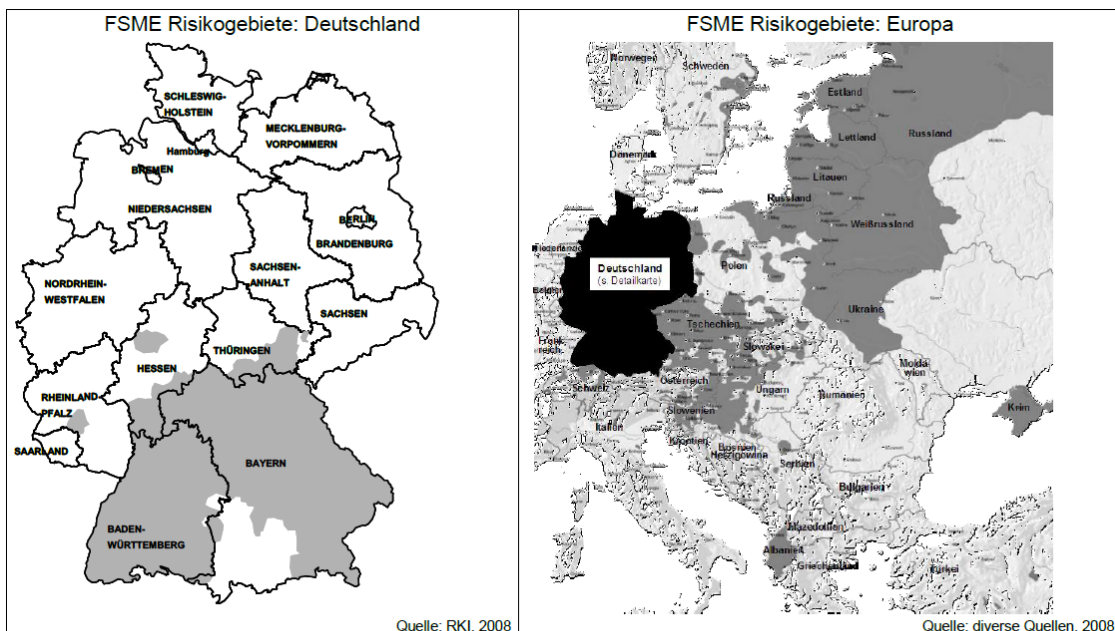
## Fragebogen

### Angaben zur Person (Von Probandin/Proband selbst auszufüllen)

1. Wie lange leben Sie schon in der Region „Wingst“? \_\_\_\_\_ (Jahre)  
 Falls Sie **nur zu Besuch** sind:  Es ist der 1. Besuch.  Ich war schon mehrfach hier.

2. Haben Sie schon einmal in einem der **grau markierten Gebiete** in Deutschland bzw. Europa (bitte in Karte ankreuzen)...

	Ja	Nein	Weiß nicht	In welchem Jahr zuletzt?
a) gearbeitet, gewohnt oder Urlaub gemacht?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
b) Wurden Sie dort von Zecken gestochen?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	



3. Wie viele Zeckenstiche hatten Sie **in den letzten 12 Monaten**?  
 keine  1-10  11-20  21-50  Mehr als 50

4. FSME Prophylaxe

	Ja	Nein	Weiß nicht	Wie oft? Wann zuletzt?
a) Wurden Sie bereits gegen FSME geimpft?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
b) Wurde Ihnen schon einmal nach einem Zeckenstich FSME-Immunglobulin gegeben?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

5. Haben Sie eine der unten angeführten Impfungen erhalten?

	Ja	Nein	Weiß nicht	Wie oft?	In welchem Jahr?
Gelbfieber	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Japanische Enzephalitis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

6. Wurde bei Ihnen bereits eine der folgenden Erkrankungen festgestellt und wenn ja, wann und wo?

	Ja	Nein	Weiß nicht	In welchem Jahr? Wo infiziert?
Borreliose	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
FSME	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

7. Sollten sich nach der Untersuchung noch Fragen ergeben, wären Sie dann damit einverstanden, dass sich das Niedersächsische Landesgesundheitsamt direkt mit Ihnen in Verbindung setzt?

Ja  Nein

**Wenn ja**, bitte Telefonnummer (tagsüber) angeben: \_\_\_\_\_

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!



Teilergebnisse dieser Arbeit wurden im folgenden Beitrag veröffentlicht:

Monazahian M, Timmerberg C, Baillot A, Marchwald B, Eiffert H, Pulz M: **Investigation of Ixodes ricinus ticks in relation to Tick-Borne- Encephalitis (TBE) virus, Borrelia and Anaplasma phagocytophilum in a region in Lower Saxony, Germany.** Vortrag (gehalten 21. 03. 2009) in: X International Jena Symposium on Tick- borne diseases, Weimar, 19. bis 21. April 2009, o. Hrsg., o. Verl. 2009

## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei allen, die mich bei der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Dr. Eiffert für das Ermöglichen dieser interessanten und vielseitigen Arbeit und seine aufmunternden und motivierenden Worte danken.

Besonders danken möchte ich Dr. Monazahian (NLGA) für die immer unkomplizierte, nette und vorbildliche Betreuung und Hilfe bei dem experimentellen Teil der Arbeit und für die konstruktive Kritik der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit.

Mein herzlichster Dank gilt Birgit Marchwald, Petra Ahmed und Meike Böhm für die liebenswerte und geduldige Unterstützung, Hilfsbereitschaft und freundliche Aufnahme in das Laborteam.

Ich danke Dr. Pulz und allen Mitarbeitern des Niedersächsischen Landesgesundheitsamtes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin danke ich Dr. Beyrer für die Unterstützung bei der Seroprävalenzstudie.

Ich danke Dr. Hartelt vom Landesgesundheitsamt Baden- Württemberg für die Überlassung der positiven Kontrollen für die Untersuchung auf *A. phagozytophilum*.

Ich danke Dr. Jung, Medizinische Statistik der Universität Göttingen, für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ich danke Dr. Röthig, Hausarzt in der Wingst, für das Rekrutieren der Probanden der Seroprävalenzstudie.

Für die Ermöglichung meines Studiums und die Korrekturarbeiten möchte ich meiner Familie herzlich danken. Auch meinen Freunden vielen Dank für die Unterstützung und Aufmunterung.