

Epidemiologie von *Coxiella burnetii*,
Rickettsia spp., FSME- und Hantaviren
in Süddeutschland unter Berücksichtigung
klimatischer Veränderungen

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

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Zoologie
Fachgebiet Parasitologie

und

Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg
im Regierungspräsidium Stuttgart

vorgelegt von
Silvia Pluta

aus Filderstadt

2011

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person: Prof. Dr. Ute Mackenstedt
2. berichtende Person: Prof. Dr. Johannes Steidle
3. Prüfer: Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig
Eingereicht am: 24. Mai 2011
Mündliche Prüfung am: 28. Juli 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 26.7.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ferner erkläre ich, dass nicht bereits früher oder gleichzeitig ein Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens unter Vorlage der hier eingereichten Dissertation gestellt wurde.

Stuttgart-Hohenheim, den 18.5.2011

Silvia Pluta

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	i
1. EINLEITUNG	1
1.1 Vektor- und nagerassoziierte Infektionskrankheiten	1
1.1.1 Begriffe und Definitionen	2
1.1.2 Klima und vektorübertragene Infektionskrankheiten	2
1.1.2.1 Klimaprognosen	3
1.1.2.2 Einfluss von Klimaveränderungen auf Vektoren, Wirte und Pathogene	4
1.2 Zecken als Krankheitsüberträger	7
1.2.1 Systematik	7
1.2.2 Biologie	7
1.2.3 Medizinische Bedeutung	13
1.3 Nager als Krankheitsüberträger	16
1.3.1 Systematik	16
1.3.2 Biologie	16
1.3.2.1 Arvicolinae	17
1.3.2.2 Murinae	20
1.3.3 Medizinische Bedeutung	21
1.4 <i>Coxiella burnetii</i>	22
1.4.1 Historisches	22
1.4.2 Systematik und Biologie	22
1.4.3 Q-Fieber	25
1.4.4 Epidemiologie	27
1.4.5 Verbreitung	28
1.5 <i>Rickettsia</i> spp.	31
1.5.1 Historisches	31
1.5.2 Systematik	32
1.5.3 Verbreitung	34
1.5.4 Biologie	35
1.5.5 Rickettsien als Krankheitserreger	36
1.6 FSME-Viren	39
1.6.1 Historisches	39
1.6.2 Systematik	39
1.6.3 Biologie	41
1.6.4 FSME	43
1.6.5 Epidemiologie und Verbreitung	45
1.7 Hantaviren	48
1.7.1 Historisches	48
1.7.2 Systematik und Biologie	49
1.7.3 Erkrankung	50
1.7.4 Epidemiologie und Verbreitung	53
1.8 Ziele der Arbeit	57
2. MATERIAL UND METHODEN	59
2.1 Material	59
2.1.1 Zecken	59
2.1.1.1 <i>Dermacentor</i> spp.	59
2.1.1.2 <i>Ixodes ricinus</i>	60

2.1.2	Nager.....	61
2.1.2.1	Fang	61
2.1.2.2	Sektion.....	64
2.1.3	Patientenseren	65
2.2	Molekularbiologische Methoden	66
2.2.1	Nukleinsäure-Extraktion	66
2.2.2	Prinzip der PCR.....	67
2.2.3	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese.....	68
2.2.4	Prinzip der realtime-PCR	68
2.2.5	Prinzip der DNA-Sequenzierung.....	70
2.2.6	Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen.....	72
2.3	Serologische Methoden	74
2.3.1	Prinzip der Komplementbindungsreaktion	74
2.3.2	Prinzip des ELISA.....	75
2.3.3	Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztests.....	75
2.4	Erregernachweise.....	77
2.4.1	<i>Coxiella burnetii</i>	77
2.4.1.1	Molekularbiologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i>	77
2.4.1.1.1	Extraktion von Nukleinsäuren.....	77
2.4.1.1.2	PCR der IS1111-Region.....	78
2.4.1.1.3	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	79
2.4.1.1.4	Überprüfung der Eignung von Nagerorganen für die <i>C. burnetii</i> -PCR	80
2.4.1.2	serologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i> -Antikörpern	80
2.4.1.2.1	Komplementbindungsreaktion (KBR)	80
2.4.1.2.2	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	81
2.4.2	<i>Rickettsia</i> spp.	83
2.4.2.1	Molekularbiologischer Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp.....	83
2.4.2.1.1	TaqMan realtime-PCR des <i>gltA</i> -Gens.....	83
2.4.2.1.2	Blockcycler-PCR des <i>rOmpA</i> -Gens	84
2.4.2.1.3	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	85
2.4.2.1.4	Blockcycler-PCR des <i>gltA</i> -Gens.....	85
2.4.2.1.5	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	86
2.4.2.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	87
2.4.2.2.1	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	87
2.4.2.2.2	Cycle Sequencing	87
2.4.2.2.3	Aufreinigung der Sequenzierprodukte	88
2.4.2.2.4	Kapillargelelektrophorese.....	89
2.4.2.2.5	Datenbank-Recherche	89
2.4.2.3	Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern	89
2.4.2.3.1	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	89
2.4.2.3.2	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT).....	90
2.4.3	FSME-Viren.....	92
2.4.3.1	Homogenisieren der Zecken.....	92
2.4.3.2	Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren	94
2.4.3.2.1	Nukleinsäure-Extraktion	94
2.4.3.2.2	FSME-Virus-spezifische TaqMan realtime-PCR	94
2.4.3.3	Anzucht der FSME-Viren.....	95

2.4.3.3.1	Ermitteln der Viruskonzentration	96
2.4.3.4	Charakterisierung der FSME-Viren.....	97
2.4.3.4.1	Blockcyclus-PCR des E- und NS2a-Gens	97
2.4.3.4.2	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	98
2.4.3.4.3	Sequenzierung	99
2.4.3.5	Phylogenetische Analysen.....	100
2.4.4	Hantaviren	104
2.4.4.1	Molekularbiologischer Nachweis von Puumala-Viren in Nagern und Humanseren.....	104
2.4.4.1.1	Aufreinigung von Nukleinsäuren	104
2.4.4.1.2	PCR des S-Segments	105
2.4.4.1.3	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	106
2.4.4.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	107
2.4.4.3	Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren in Nagern	108
2.5	Nachweis der Vektoren-DNA	109
2.5.1	Nachweis von Zecken-DNA mittels PCR	109
2.5.2	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	110
2.5.3	Nachweis von Nager-DNA mittels PCR.....	110
2.5.4	Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung	111
2.6	Verwendete Reagenzien und Geräte.....	111
2.6.1	Allgemeines.....	111
2.6.2	Molekularbiologische Untersuchungen	111
2.6.2.1	Nager-Sektion.....	111
2.6.2.2	Homogenisieren der Zecken.....	112
2.6.2.3	Extraktion von Nukleinsäuren	112
2.6.2.4	PCR	112
2.6.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	112
2.6.2.6	Sequenzierung	113
2.6.3	Serologische Untersuchungen.....	113
2.6.3.1	Komplementbindungsreaktion	113
2.6.3.2	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	113
2.6.3.3	indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	114
2.6.4	FSME-Virus-Zellkultur	114
2.6.5	Geräte	114
2.7	Computerprogramme	115
3.	ERGEBNISSE	116
3.1	<i>Coxiella burnetii</i>.....	116
3.1.1	Molekularbiologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i>	116
3.1.2	Serologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i> -Antikörpern.....	117
3.1.2.1	Komplementbindungsreaktion (KBR).....	118
3.1.2.2	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	119
3.1.3	Epidemiologische Daten.....	120
3.2	<i>Rickettsia</i> spp.	122
3.2.1	Molekularbiologischer Nachweis von Rickettsien	122
3.2.1.1	TaqMan real-time PCR des gltA-Gens	122
3.2.1.2	PCR des rOmpA-Gens	123

3.2.1.2.1	Dermacentor-Zecken	123
3.2.1.2.2	Nagerorgan-Proben	124
3.2.1.3	PCR des gltA-Gens	126
3.2.1.4	Sequenzierung der PCR-Produkte	127
3.2.2	Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern	129
3.2.2.1	ELISA	129
3.2.2.2	Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)	130
3.2.3	Epidemiologische Daten	132
3.2.3.1	Zecken	132
3.2.3.2	Nager	135
3.2.3.3	Geographische Lage der Fundorte	138
3.2.4	Nachweis einer <i>R. slovaca</i> -Infektion	139
3.3	FSME-Viren	140
3.3.1	Untersuchungsmaterial	140
3.3.2	Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren	141
3.3.3	Anzucht der FSME-Viren	141
3.3.3.1	Ermitteln der Viruskonzentration	142
3.3.4	Charakterisierung der FSME-Viren	143
3.3.4.1	Blockcycler-PCR des E- und NS2a-Gens	143
3.3.4.2	Sequenzierung	144
3.3.5	Phylogenetische Analysen	147
3.3.5.1	Stammbaumberechnung mit Neighbour Joining	148
3.3.5.2	Stammbaumberechnung mit Maximum Parsimony	152
3.3.6	Epidemiologische Daten	156
3.4	Hantaviren	158
3.4.1	Untersuchung von Nagern auf Puumala-Virus-Infektionen	158
3.4.1.1	Untersuchungsmaterial	158
3.4.1.2	Molekularbiologischer Nachweis von Puumala-Viren	159
3.4.1.3	Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren	159
3.4.1.4	Vergleich der molekularbiologischen und serologischen Untersuchungsergebnisse	159
3.4.1.5	Sequenzierung der PCR-Produkte	161
3.4.1.6	Epidemiologische Daten	163
3.4.2	Untersuchung von Humanseren auf Puumala-Viren	164
3.4.2.1	Molekularbiologische Untersuchung mittels PCR	164
3.4.2.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	165
3.5	Nachweis der Vektoren-DNA	168
4. DISKUSSION		169
4.1	<i>Coxiella burnetii</i>	169
4.1.1	Molekularbiologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i>	169
4.1.2	Serologischer Nachweis von <i>C. burnetii</i> -Antikörpern	170
4.1.3	Epidemiologische Daten	172
4.1.4	Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie des Q-Fiebers	179
4.2	<i>Rickettsia</i> spp.	181
4.2.1	Molekularbiologischer Nachweis von Rickettsien	181
4.2.1.1	Zecken	181
4.2.1.2	Nager	183
4.2.2	Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern	184
4.2.3	Epidemiologische Daten	187
4.2.3.1	Zecken	187

4.2.3.2	Nager.....	190
4.2.4	Medizinische Bedeutung	192
4.2.5	Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von <i>Rickettsia</i> spp.....	194
4.3	FSME-Viren	196
4.3.1	Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren	196
4.3.2	Anzucht der FSME-Viren.....	197
4.3.3	Charakterisierung der FSME-Viren.....	199
4.3.4	Phylogenetische Analysen.....	200
4.3.5	Epidemiologische Daten.....	205
4.3.6	Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von FSME-Viren	209
4.4	Hantaviren	214
4.4.1	Untersuchung von Nagern auf Puumala-Virus-Infektionen.....	214
4.4.1.1	Molekularbiologische und serologische Untersuchung	214
4.4.1.2	Sequenzierung der PCR-Produkte	217
4.4.1.3	Epidemiologische Daten	219
4.4.2	Untersuchung von Humanseren auf Puumala-Viren	221
4.4.3	Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von Hantaviren	224
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	227
6.	SUMMARY	230
7.	LITERATUR.....	232
8.	ANHANG	250
	DANKSAGUNG	251
	LEBENS LAUF	253

1. Einleitung

1.1 VEKTOR- UND NAGERASSOZIIERTE INFektionsKRANKHEITEN

Durch Vektoren, d.h. durch blutsaugende Arthropoden übertragene Infektionskrankheiten spielen in der Humanmedizin eine große Rolle. Dabei wird meist zunächst an exotische Erkrankungen gedacht, wie beispielsweise Malaria (Überträger: *Anopheles* spp.), Dengue-Fieber (Überträger: *Aedes* spp.) oder Gelbfieber (Überträger: *Aedes* spp.); diese treten in Deutschland allerdings ausschließlich als „Reise-Importe“ auf. Es gibt jedoch auch einige in Deutschland endemische Krankheitserreger, die durch Vektoren übertragen werden. Diese sind häufig nur wenig bekannt, da sie z.B. aufgrund von unspezifischen Symptomen nur selten diagnostiziert werden oder nur punktuell verbreitet sind.

In Deutschland stellen Zecken die wichtigsten Vektoren dar. Die bei weitem bekanntesten und am besten untersuchten zeckenübertragenen Erkrankungen sind die durch FSME-Viren verursachte Frühsommer-Meningoenzephalitis sowie die durch Bakterien der Gattung *Borrelia* ausgelöste Lyme-Borreliose. Für beide Erkrankungen ist *Ixodes ricinus*, die häufigste Zeckenart in Deutschland, der Hauptvektor. Daneben gibt es jedoch noch weitere, weniger gut untersuchte Pathogene, die von dieser und anderen einheimischen Zeckenarten übertragen werden können. Hierzu zählen beispielsweise *Rickettsia* spp. (Vektor: *I. ricinus*, *Dermacentor* spp.), *Anaplasma phagocytophilum* (Vektor: *I. ricinus*) oder *Babesia* spp. (Vektor: *I. ricinus*, *Dermacentor* spp.).

Neben den Arthropoden-assoziierten Erkrankungen besitzen auch durch Nagetiere und andere Kleinsäuger übertragene Zoonosen in Deutschland humanmedizinische Relevanz. Beispielsweise haben die Hantaviren in den letzten Jahren aufgrund steigender Infektionszahlen an Bedeutung und Aufmerksamkeit gewonnen. Weitere durch Nager oder Kleinsäuger übertragene Pathogene sind *Francisella tularensis* (Überträger: Hasen) und *Leptospira* spp. (Überträger: Mäuse und Ratten).

Es ist anzunehmen, dass im Falle von vektor- und nagerassoziierten Infektionen die Dunkelziffer, d.h. die Zahl der nicht diagnostizierten humanen Erkrankungen, aufgrund der häufig unspezifischen Symptomatik sehr hoch ist. Hinzu kommt, dass die Epidemiologie der Erreger, d.h. ihre Übertragungswege auf den Menschen oder ihre Verbreitung in Naturherden, in vielen Fällen noch nicht vollständig geklärt ist. Um

die Gefährdung des Menschen durch vektor- und nagerassoziierte Infektionskrankheiten einschätzen zu können, ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, deren Häufigkeit und Verbreitung zu kennen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Epidemiologie einiger zecken- und nagerassoziiierter humanpathogener Krankheitserreger (*Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp. FSME-Viren und Hantaviren) in Süddeutschland untersucht, um grundlegende epidemiologische Daten zu gewinnen. Dabei wurde auch die Rolle von klimatischen Veränderungen in der Epidemiologie dieser Infektionserreger berücksichtigt.

1.1.1 Begriffe und Definitionen

Im Folgenden werden einige Begriffe, die im Zusammenhang mit vektorübertragenen Infektionskrankheiten von Bedeutung sind, erläutert.

Unter einer **Zoonose** versteht man ganz allgemein Erkrankungen, die unter natürlichen Bedingungen von Tieren auf den Menschen übertragen werden. Diese Übertragung kann über **Vektoren**, z.B. blutsaugende Arthropoden, erfolgen, die die Erreger von einem tierischen Wirt auf den Menschen übertragen. Wirtstiere können jedoch auch selbst als Überträger fungieren; in diesem Falle erfolgt die Infektion direkt durch Kontakt mit infizierten Tieren oder indirekt über deren Ausscheidungen. Als **Vektorkompetenz** wird die Empfänglichkeit eines Vektors für einen Krankheitserreger bezeichnet sowie die Fähigkeit, den Erreger auf einen Wirt zu übertragen. Ein **Naturherd** ist ein begrenzter geographischer Bereich mit einem bestimmten Biotop, in dem ein Erreger zwischen Wirten und Vektoren zirkuliert. Zwischen den beteiligten Arten bestehen dabei wechselseitige Beziehungen, sodass der Kontakt zwischen ihnen und damit die Übertragung des Erregers gewährleistet ist. Als **Reservoirwirt** oder tierisches Reservoir wird ein Wirt bezeichnet, in dem ein Erreger über längere Zeit persistiert und der als Ausgangspunkt für Infektionen des Menschen dient (Mehlhorn und Piekarski, 2002; Hiepe et al., 2006).

1.1.2 Klima und vektorübertragene Infektionskrankheiten

Das Klima hat als abiotischer Faktor großen Einfluss auf Vektoren und somit auch auf die mit ihnen assoziierten Pathogene. Dabei stellen Temperatur, Niederschlag und Feuchtigkeit die wichtigsten Faktoren dar. Neben der geographischen Verbreitung werden auch die Abundanz und Aktivitätszeiten von Vektoren und ihren

Wirten entscheidend durch diese Faktoren beeinflusst und limitiert. Aufgrund der unterschiedlichen Ansprüche der Vektoren an ihr (Mikro-)Habitat können Veränderungen des Klimas je nach Vektor und Pathogen positive Auswirkungen zeigen, d.h. für eine höhere Verbreitung sorgen, oder negative Folgen haben, d.h. einen Rückgang der Verbreitung bewirken (Gray et al., 2009).

Da vektorassoziierte Infektionskrankheiten in komplexe Zyklen aus Vektoren, Pathogenen und Wirten eingebunden sind, die untereinander in vielfältiger Beziehung stehen, spielen in ihrer Epidemiologie neben dem Klima weitere Umweltfaktoren sowie anthropogene Einflüsse ebenfalls eine Rolle (Pfeffer und Dobler, 2010; Tabachnick, 2010).

1.1.2.1 Klimaprognosen

Klimatische Veränderungen können durch natürliche Prozesse, wie z.B. Vulkanausbrüche oder Schwankungen der Sonneneinstrahlung, verursacht werden; in erster Linie spielen jedoch anthropogene Faktoren eine entscheidende Rolle, beispielsweise die Emission von Treibhausgasen. Für die Prognose der Klimaveränderungen werden verschiedene Modelle und Szenarien verwendet, die sowohl natürliche als auch anthropogene Einflüsse auf das Klima berücksichtigen. Je nach Modell unterscheiden sich die prognostizierten Veränderungen in Details voneinander, die generellen Trends stimmen jedoch überein. Diese werden im Folgenden erläutert.

In den nächsten hundert Jahren wird mit einer globalen Erwärmung von 1,8-4°C gerechnet. Die Temperaturerhöhung soll dabei in den nördlichen Breiten deutlich stärker ausfallen als im Süden (Roeckner und Jacob, 2008). Die Prognosen für die Entwicklung der Niederschlagsmengen sind weniger einheitlich. In einigen Regionen werden höhere Niederschlagsmengen erwartet, z.B. in Äquatornähe und in nördlichen Breiten; für andere Gebieten werden dagegen geringere Mengen vorausgesagt, wie beispielsweise für Südafrika oder den Mittelmeerraum (Roeckner und Jacob, 2008).

Für Deutschland sagt das gängige Modell einen Anstieg der Durchschnittstemperaturen um 0,6-1,8°C in den nächsten 50 Jahren voraus. Der Temperaturanstieg fällt dabei im Süden stärker aus als in den nördlichen Bereichen. Die Vorhersagen bezüglich der Entwicklung der Niederschläge unterscheiden sich dagegen je nach Region. Während für den Süden steigende Niederschlagsmengen

erwartet werden, zeigen die Modelle für den Norden eher zurückgehende Niederschläge (Gerstengarbe und Werner, 2008; Roeckner und Jacob, 2008).

Für Baden-Württemberg ist in Zukunft mit heißen, trockenen Sommern und feuchten Wintern zu rechnen (Gerstengarbe und Werner, 2008).

1.1.2.2 Einfluss von Klimaveränderungen auf Vektoren, Wirte und Pathogene

Viele **Arthropoden**, die als Vektoren von Pathogenen fungieren, haben sehr spezifische Ansprüche an ihr Biotop und die dort herrschenden klimatischen Bedingungen. Veränderungen in diesen klimatischen Bedingungen können zum einen direkte Einflüsse ausüben, indem beispielsweise die Entwicklung der Vektoren beschleunigt oder deren saisonales Aktivitätsmuster verändert wird. Auch indirekte Auswirkungen können auftreten, z.B. durch Veränderungen der Vegetation oder veränderte Verfügbarkeit der Wirte (Gray et al., 2009). Es gibt bereits einige Beispiele für eine Ausbreitung einzelner Vektoren in den letzten Jahren. Lindgren et al. (2000) zeigten, dass sich *I. ricinus* in Schweden in den letzten zwanzig Jahren nach Norden ausgebreitet hat. Lag die Grenze der Verbreitung dort in den 1980er Jahren noch bei 61°N, so wurde die Zecke Mitte der 1990er Jahre bereits bis zu 66°N gefunden. In Deutschland weist die Auwaldzecke *Dermacentor reticulatus* heute ein deutlich größeres Verbreitungsgebiet auf als in den vergangenen Jahrzehnten; eine weitere Ausbreitung der Art wird erwartet (Dautel et al., 2006).

Neben der Ausbreitung endemischer Vektoren ermöglichen veränderte klimatische Bedingungen die Ansiedlung von Arthropoden, die in einem Gebiet bisher nicht endemisch sind. Hierbei sind besonders thermophile Arten zu berücksichtigen, die durch die prognostizierte Erwärmung bzw. die Erhöhung der Durchschnittstemperaturen deutlich profitieren. Mit den Vektoren können sich auch die durch sie übertragenen Pathogene ansiedeln. An der Einschleppung von Vektoren oder Pathogenen in neue Gebiete ist der Mensch häufig entscheidend beteiligt. Pathogene können dabei entweder mit infizierten Vektoren eingeschleppt werden, oder über virämische, bakteriämische bzw. parasitämische Wirte, über die sich wiederum endemische Vektoren infizieren können. In beiden Fällen ist in der Folge die Etablierung eines Naturherds möglich. Ein Beispiel für eine Neuansiedlung eines nicht endemischen Vektors ist die Einschleppung und Ausbreitung von *Aedes albopictus* in den USA und Europa über Altreifen (Pfeffer und Dobler, 2010;

Randolph und Rogers, 2010). Die Ausbreitung der früher in Deutschland nicht endemischen Blauzungenkrankheit im Jahr 2006 ist ein Beispiel für die Ansiedlung einer Infektionskrankheit in neuen Gebieten. Man geht davon aus, dass das Blue Tongue-Virus durch den Import infizierter Tiere aus Endemiegebieten nach Deutschland eingeschleppt wurde und sich in der Folge in einheimischen Vektoren etablieren konnte (Tabachnick, 2010).

Für Deutschland stellt vor allem die Einschleppung von Vektoren und Pathogenen, die bisher nur im Mittelmeerraum verbreitet sind, ein realistisches Risiko dar. Hierzu gehören beispielsweise die Schildzecke *Rhipicephalus sanguineus*, die den Erreger des Mittelmeerfleckfiebers (*Rickettsia conorii*) überträgt, sowie Sandmücken, die als Vektoren der Leishmaniose-Erreger (*Leishmania* spp.) fungieren (Kimmig et al., 2010).

Da nicht nur die Verbreitung, sondern auch die Entwicklung und Vermehrung der Vektoren von klimatischen Bedingungen abhängig ist, kann sich die Abundanz eines Vektors infolge der Klimaveränderung erhöhen. In Schweden wurde beispielsweise in den 1990er Jahren eine erhöhte Populationsdichte von *Ixodes ricinus* verbunden mit einer zunehmenden Verbreitung der Zeckenart nach Norden ermittelt; zeitgleich war eine erhöhte Zahl an FSME-Erkrankungen festzustellen (Lindgren et al., 1998; Lindgren et al., 2000).

Auch die Aktivitätsphasen der Zecken können sich infolge veränderter klimatischer Bedingungen ändern. So konnten Dautel et al. (2008) während des sehr milden Winters 2006/2007 in einem Berliner Wald von Mitte November bis Anfang März wirtssuchende Nymphen und Adulte der Art *I. ricinus* nachweisen, deren Aktivitätsperiode gewöhnlich Anfang November endet.

Nicht nur die Vektoren, auch die **Pathogene** selbst werden durch klimatische Bedingungen beeinflusst. Beispielsweise kann die Entwicklung im Vektor von einer bestimmten Temperatur abhängig sein, was wiederum die geographische Verbreitung des Erregers einschränkt.

Die Verbreitung und die Abundanz von **Nagetieren**, die als Reservoirwirte und Überträger von Zoonosen dienen, werden ebenfalls durch klimatische Faktoren beeinflusst. Dabei spielen neben Temperatur und Niederschlag vor allem extreme Wetterereignisse wie Überschwemmungen oder Dürreperioden eine Rolle. Als

direkte Wirkung von starken Regenfällen oder Überschwemmungen kommt es beispielsweise zum Abwandern von Nagern aus einem Gebiet und zur Einwanderung in andere Gebiete, die eventuell näher an menschlichen Behausungen liegen. Da auf diese Weise die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Menschen und Nagern erhöht ist, kann sich in der Folge das Infektionsrisiko für den Menschen ebenfalls erhöhen. Die Veränderung von Vegetationsbedingungen hat indirekt ebenfalls einen Einfluss auf die Verbreitung und Abundanz der Nager, indem z.B. das Futterangebot oder die Deckungsmöglichkeiten verändert werden (Essbauer et al., 2008).

Ebenso wie die Verbreitung der Arthropoden wird auch diejenige der Nager nicht nur durch klimatische Faktoren beeinflusst. Andere Umweltfaktoren, wie die Abundanz von Feinden oder Infektionen mit Krankheitserregern, die eine Population dezimieren können, spielen ebenfalls eine Rolle. Auch anthropogene Einflüsse, beispielsweise durch land- und forstwirtschaftliche Nutzung von Habitaten oder die Bekämpfung von Nagern, tragen zu Veränderungen in deren Verbreitung bei.

Um den Einfluss der prognostizierten klimatischen Veränderungen auf die Epidemiologie von vektor- und nagerassoziierten Infektionskrankheiten sowie das damit einhergehende Infektionsrisiko für den Menschen einschätzen zu können, sind kontinuierliche Untersuchungen nötig. So muss zum einen der „status quo“ erfasst werden, d.h. die aktuelle Verbreitung der Vektoren und Pathogene. Zum anderen müssen diese medizinisch relevanten Überträger und Erreger über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, um mögliche Veränderungen in ihrer Epidemiologie und damit im Infektionsrisiko für den Menschen zu erkennen.

1.2 ZECKEN ALS KRANKHEITSÜBERTRÄGER

1.2.1 Systematik

Zecken gehören systematisch zur Ordnung Metastigmata innerhalb der Klasse der Acari (Milben). Alle Arten dieser Ordnung sind obligat blutsaugende Ektoparasiten; zudem stellen Zecken die größten Vertreter der Milben dar.

Neben den Schildzecken (*Ixodidae*) gehören die Lederzecken (*Argasidae*) sowie die *Nutalliellidae*, von denen bisher nur eine einzige Art bekannt ist, in die Ordnung der metastigmaten Milben. Die systematische Einteilung der Zecken innerhalb des Stamms der Arthropoden ist in Abb. 1 dargestellt, wobei nur die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Arten berücksichtigt sind.

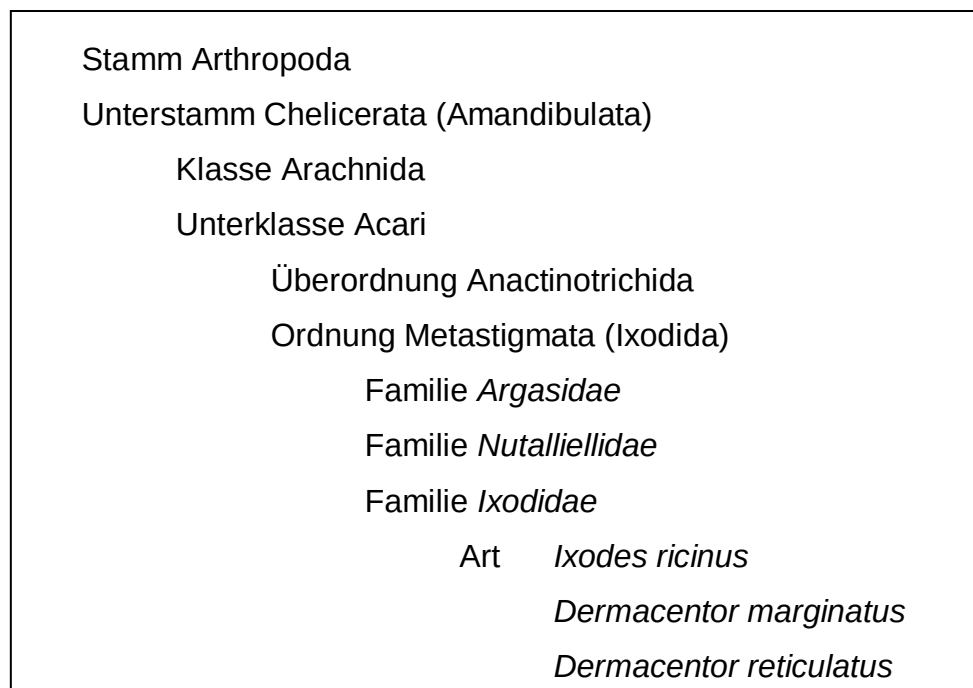


Abb. 1: Systematische Einteilung der Zecken (nach Hiepe et al., 2006; verändert)

1.2.2 Biologie

Schild- (*Ixodidae*) und Lederzecken (*Argasidae*) können anhand ihrer Morphologie und Lebensweise unterschieden werden. Während die Schildzecken einen harten Dorsalschild besitzen, der als Scutum bezeichnet wird, zeichnen sich Lederzecken durch eine ledrige, oft mit warzenartigen Erhebungen versehene Körperoberfläche ohne Rückenschild aus. Lederzecken leben ausschließlich nidicol, d.h. in Nestern oder Höhlen ihrer Wirte. Die Dauer der Blutaufnahme ist bei Zecken dieser Familie

sehr kurz. Im Gegensatz dazu sind Vertreter der *Ixodidae* meist „Freilandzecken“, die offene Habitate wie Wälder oder Grasland bewohnen. Diese Zecken sind ausgesprochene Langzeitsauger; die Saugdauer kann mehrere Tage betragen.

Die *Ixodidae* sind, mit Ausnahme der Arktis und der Antarktis, weltweit verbreitet. Ihr Lebenszyklus umfasst drei Stadien, die sich morphologisch unterscheiden lassen. Die Larve besitzt lediglich drei Beinpaare, wohingegen sowohl das einzige Nymphenstadium als auch die Adulten vier Beinpaare aufweisen. Die Weibchen sind generell größer als die Männchen. Das Scutum bedeckt bei Weibchen nur einen kleinen Teil des Hinterleibs, bei Männchen ist dieser komplett bedeckt. Somit zeigen die *Ixodidae* einen deutlichen Sexualdimorphismus.

Die Wirtsfindung der Zecken wird durch ein spezielles Sinnesorgan, das grubenförmige, mit Sinnesborsten ausgestattete Haller'sche Organ, ermöglicht. Es befindet sich dorsal auf den Tarsen des ersten Beinpaares. Mit Hilfe dieses Organs können verschiedene Substanzen, vor allem CO₂, Ammoniak und Milchsäure, wahrgenommen werden. Die meisten Zecken klettern, je nach Größe des jeweiligen Stadiums, bis zu 1 m hoch auf die Vegetation, strecken das vordere Beinpaar, auf dem sich die Haller'schen Organe befinden, weit nach vorne und lassen sich von geeigneten Wirten abstreifen. Auf dem Wirt wird zunächst eine für den Saugakt geeignete Körperstelle gesucht; dies sind vor allem feuchte und dünnhäutige Bereiche wie Achselhöhle oder Leistengegend.

Die Mundwerkzeuge der *Ixodidae* sind der Lebensweise als blutsaugende Ektoparasiten mit langandauernder Blutmahlzeit angepasst. Die zweigliedrigen Chelizeren sind mit nach außen gerichteten Zähnen versehen. Sobald die Zecke eine geeignete Körperstelle gefunden hat, wird die Haut des Wirts mit Hilfe der Chelizeren horizontal aufgerissen. Das Hypostom, das eine dorsale Rinne aufweist, wird in den Stichkanal geschoben und durch symmetrisch angeordnete, nach hinten gerichtete Widerhaken in der Wirtstierhaut verankert. Über die Speicheldrüsen werden verschiedene Substanzen, darunter entzündungshemmende und blutgerinnungshemmende Stoffe, in die Wunde injiziert. Ein Teil des Speicheldrüsensekrets, der als Zement bezeichnet wird, härtet um die Mundwerkzeuge herum aus, sodass die Verankerung der Zecke verstärkt wird. Blut und Gewebsflüssigkeiten, die durch histolytische Bestandteile des Speichels gebildet werden, werden von der Zecke aufgesaugt. Das Volumen der aufgenommenen

Substanzen kann dabei, vor allem bei adulten Weibchen, das Körpergewicht um das Hundertfache übersteigen. Dabei wird die Oberfläche des Hinterleibs irreversibel gedehnt.

Jedes Entwicklungsstadium der *Ixodidae* muss einmal Blut aufnehmen. Je nach Anzahl der Wirtswechsel unterscheidet man dreiwirtige Zecken, bei denen jedes Entwicklungsstadium einen eigenen Wirt aufsucht, von zwei- und einwirtigen Arten, die entsprechend seltener den Wirt wechseln. Die Larven und Nymphen benötigen die in der Nahrung enthaltenen Eiweißstoffe zum Wachstum und zur Häutung, während diese Substanzen bei adulten Weibchen zur Eiproduktion notwendig sind. Abhängig von Zeckenart und -stadium findet die anschließende Häutung auf demselben Wirt oder in der Bodenvegetation statt.

Die Paarung erfolgt bei den meisten Arten auf dem Wirt, kann aber auch in der Vegetation ablaufen, z.B. bei *Ixodes* spp. Das Männchen legt mit Hilfe der Chelizeren Spermapakete, sogenannte Spermatophoren, auf der Geschlechtsöffnung des Weibchens ab; die Samen dringen anschließend aktiv ein. Nach dem Saugakt lässt sich das befruchtete Weibchen von seinem Wirt abfallen. Am Boden findet zunächst eine Ruhepause statt, in der die Blutmahlzeit verdaut wird und die Eier reifen. Schließlich werden 2000-20000 Eier auf einmal abgelegt. Das Weibchen stirbt direkt nach der Eiablage ab (Kimmig et al., 2001a; Hiepe et al., 2006; Lucius und Loos-Frank, 2008). In Abb. 2 ist beispielhaft der Entwicklungszyklus von *I. ricinus* dargestellt.

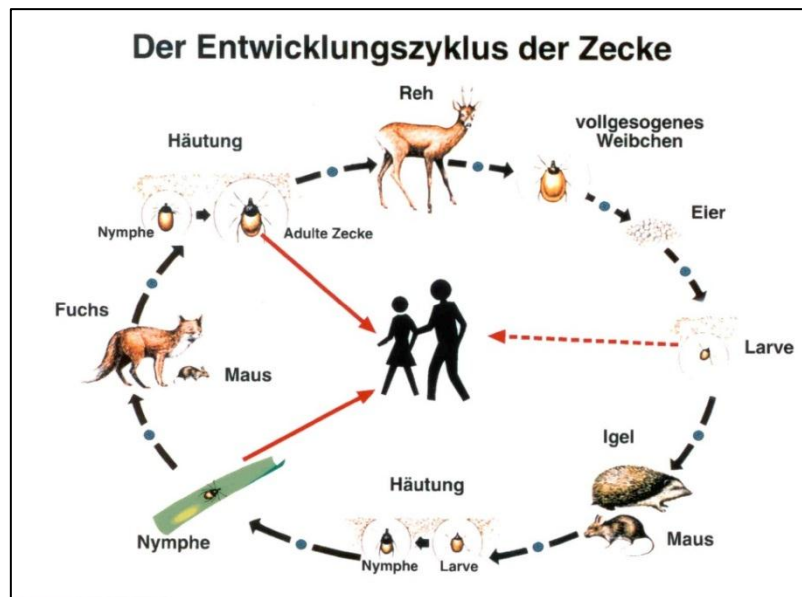


Abb. 2: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus* (Quelle: www.zeckenschule.de).

Ixodes ricinus, der Gemeine Holzbock, ist die häufigste Zeckenart in Deutschland. Das Scutum ist dunkelbraun bis schwarz gefärbt, der Hinterleib der Weibchen erscheint kräftig rot (Abb. 3). Die Larven sind etwa 0,5mm, die Nymphen 1mm groß. Die adulten Zecken zeigen eine Größe von 2-3mm (Männchen) bzw. 3-4mm (Weibchen). Vollgesogene Weibchen können bis zu 1cm groß werden (Kimmig et al, 2001a; Lucius und Loos-Frank, 2008).



Abb. 3: Entwicklungsstadien von *Ixodes ricinus*. Von links nach rechts: adultes Männchen, adultes Weibchen, Nympe, Larve (Bild: Dr. Hans Dautel, Berlin).

Das bevorzugte Habitat von *I. ricinus* stellen Laub- und Mischwälder mit dichtem krautigem Unterwuchs und laubreichem Boden dar. *I. ricinus* ist eine dreiwirtige Zeckenart; die bevorzugten Wirtstiere der Larven und Nymphen sind kleine Säugetiere, v.a. Nager, während die adulten Zecken meist größere Wirte wie Füchse oder Reh- und Rotwild befallen. Alle Stadien können auch am Menschen saugen. Da alle Entwicklungsstadien von *I. ricinus* lange Hungerperioden tolerieren und im Boden überwintern können, kann sich ein kompletter Entwicklungszyklus über 2-6 Jahre erstrecken (Liebisch, 1991).

Die optimalen Lebensbedingungen von *I. ricinus* sind eine hohe Luftfeuchtigkeit von 80% sowie Temperaturen ab 20°C. In Deutschland und anderen mitteleuropäischen Ländern zeigt die Art zwei Hauptaktivitätszeiten von Mai bis Juni sowie September bis Oktober. In dieser Zeit ist somit das Stichrisiko am größten (Kimmig et al., 2001a).

Zwei weitere in Deutschland endemische Zeckenarten sind die Schafzecke ***Dermacentor marginatus*** und die Auwaldzecke ***Dermacentor reticulatus***. Beide Arten sind durch eine helle, emailleartige Musterung des Scutums gekennzeichnet (Abb. 4). Morphologisch sind sie nur schwer voneinander zu unterscheiden. *D. reticulatus* besitzt, im Gegensatz zu *D. marginatus*, zwei nach hinten gerichtete Dornen am ersten Pedipalpenglied.

Die Larven und Nymphen beider Arten sind nidicol, im Freiland tauchen daher ausschließlich die 3-6,5mm großen adulten Tiere auf. Die Hauptwirte der Larven und Nymphen sind Nager und andere Kleinsäuger, während die adulten Tiere an großen Haus-, Nutz- und Wildtieren zu finden sind. Adulte *D. marginatus* saugen vor allem an Schafen (Hillyard, 1996; Kimmig et al., 2001a).



Abb. 4: Weibchen (links) und Männchen (rechts) von *Dermacentor reticulatus* (Bild: Dr. Rainer Oehme, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg).

Sowohl *D. marginatus* als auch *D. reticulatus* sind thermophile Zecken, deren Stadien unterschiedliche saisonale Aktivitätsmuster zeigen. Die Larven und Nymphen benötigen hohe Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit. Sie sind ausschließlich im Sommer aktiv. Da beide Stadien nur eine geringe Kältetoleranz zeigen, ist eine Überwinterung nicht möglich. Die adulten Tiere sind hingegen in den kühleren Monaten, d.h. im Frühjahr von Februar bis April sowie im Herbst von September bis November aktiv, während sie die Sommermonate inaktiv im Boden verbringen. Adulte *Dermacentor*-Zecken, sowohl nüchterne Männchen und Weibchen als auch vollgesogene Weibchen, zeigen eine ausgesprochen starke Kältetoleranz. Sie können sogar kurze Perioden bei weit unter -10°C überleben, was eine Überwinterung selbst in langen, harten Wintern ermöglicht (Zahler et al., 1996; Dörr et al., 2001).

Die Weibchen legen ihre Eier immer im Frühjahr, unabhängig davon, ob die Blutmahlzeit im Frühjahr oder im vorangegangenen Herbst stattgefunden hat (Kahl und Dautel, 2008). Da Larven und Nymphen nicht überwintern können und zudem keine längeren Hungerperioden tolerieren, läuft der gesamte Entwicklungszyklus von *Dermacentor*-Zecken, im Gegensatz zur Entwicklung von *I. ricinus*, innerhalb von 1-1,5 Jahren ab.

D. marginatus und *D. reticulatus* unterscheiden sich in ihren Habitatsansprüchen und dementsprechend in ihrer Verbreitung.

D. marginatus benötigt warme, trockene Habitate mit direkter Sonneneinstrahlung. Sie kommt daher vor allem auf offenen Grasflächen, wie Viehweiden oder Hochwasserdämmen, vor. Ihre Verbreitung ist auf wenige Gebiete in Süddeutschland beschränkt: das Verbreitungsgebiet erstreckt sich im Rheintal von Lörrach im Süden nordwärts bis nach Mainz. Weitere Vorkommen existieren im Maintal von Mainz nach Osten hin bis Bamberg (Liebisch und Rahman, 1976).

D. reticulatus ist an kühlere und feuchtere Habitate angepasst. Sie kommt vor allem in Auwäldern oder an Waldrändern vor. Im Gegensatz zu *D. marginatus* wurde diese Art bereits in vielen Gebieten Deutschlands nachgewiesen; besonders weit verbreitet scheint sie im Süden und Osten zu sein. Dabei kommt sie jedoch nicht flächendeckend, sondern vielmehr inselartig vor. Untersuchungen legen nahe, dass die Verbreitung von *D. reticulatus* in Deutschland in den letzten Jahren zugenommen hat (Dautel et al., 2006). Sofern die Luftfeuchtigkeit in ihrem Habitat hoch genug ist, können adulte *D. reticulatus* noch bis in den Juni hinein aktiv sein; sie zeigen somit eine etwas längere Aktivitätsphase als *D. marginatus* (Zahler et al., 1996).

1.2.3 Medizinische Bedeutung

Zecken können auf vielfache Weise medizinische und veterinärmedizinische Schäden verursachen. **Direkte Stichschäden** sind besonders in der Veterinärmedizin von Bedeutung. Nutztiere werden durch die Stiche der Zecken unruhig, was die Produktivität verschlechtern kann. Starker Zeckenbefall kann zudem zu Anämien führen, die besonders bei Jungtieren Probleme bereiten. Einige Zeckenarten, wie die in Australien verbreitete *Ixodes holocyclus*, besitzen in ihren Speichelsekreten Substanzen, die Toxikosen oder Zeckenparalysen auslösen können. Diese können auch tödlich verlaufen. **Sekundäre Stichschäden** spielen in der Veterinärmedizin ebenfalls eine Rolle. So können sich die Stichstellen durch sekundären Bakterienbefall entzünden; zudem werden die offenen Wunden häufig von Myiasis auslösenden Dipteren befallen (Hiepe et al., 2006).

Für die Humanmedizin ist die Rolle der Zecken als **Vektoren** von Krankheitserregern von größter Bedeutung. Zecken können sowohl Viren und Bakterien als auch Protozoen übertragen. Dabei kann ein Erreger häufig durch verschiedene Zeckenarten übertragen werden; gleichzeitig dient eine Zeckenart meist als Vektor

für verschiedene Pathogene. Im Falle von Protozoen, z.B. *Babesia* spp. oder *Theileria* spp., dienen Zecken nicht nur als reine Überträger, sondern auch als Zwischenwirte, in denen ein Teil der Entwicklung des Parasiten abläuft (Lucius und Loos-Frank, 2008). Tab. 1 gibt einen Überblick über einige durch Zecken übertragene Pathogene.

Tab. 1: Einige durch Zecken übertragene Pathogene (nach Hiepe et al., 2006; verändert)

	Erreger	Vektor	Wirt	Erkrankung
Viren	FSME-Virus	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Mensch	Frühsommer-Meningoenzephalitis
	Louping-ill-Virus	<i>Ixodes ricinus</i>	Schaf	Louping-ill
Bakterien	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia garinii</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Mensch	Lyme-Borreliose
	<i>Borrelia duttoni</i>	<i>Ornithodoros moubata</i>	Mensch	Zeckenrückfallfieber
	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Boophilus</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp.	Rind	Rinderanaplasmose
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Dermacentor andersoni</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Amblyomma americanum</i>	Mensch Hund	Rocky Mountain spotted fever
Protozoen	<i>Babesia canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Hund	Hundebabesiose
	<i>Babesia</i> spp.	<i>Boophilus</i> spp. <i>Rhipicephalus</i> spp. <i>Ixodes</i> spp.	Rind	Rinderbabesiose
	<i>Theileria annulata</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Rind	Mittelmeerküstenfieber

Ein Erreger kann häufig auch innerhalb einer Zeckenpopulation weitergegeben werden. Dabei bezeichnet die **transovarielle Übertragung** die Weitergabe des Pathogens an die nächste Generation durch Infektion der Oocyten der Weibchen. Bei der **transstadialen Übertragung** werden die Erreger von einem Entwicklungsstadium der Zecke an das nächste weitergegeben.

Bei einigen Pathogenen spielt neben der Infektion der Vektoren über das Saugen an einem infizierten Wirt das sogenannte **Co-Feeding** eine Rolle. Dabei saugen infizierte (v.a. Nymphen) und nicht-infizierte Zecken (v.a. Larven) zeitgleich in räumlicher Nähe an einem Wirt, der keine Infektion aufweist. Die Pathogene werden über Wirtszellen von Einstichstelle zu Einstichstelle transportiert. Voraussetzung für

diese Art der Übertragung ist die zeitgleiche Aktivität von unterschiedlichen Zeckenstadien, wie sie beispielsweise bei *I. ricinus* vorkommt (Randolph et al., 1996; Labuda et al., 1996). Das Co-Feeding spielt vor allem in der Übertragung von FSME-Viren eine Rolle, da die Wirtstiere hier in der Regel nur eine kurze virämische Phase haben, wodurch eine „herkömmliche“ Infektion der Zecken erschwert wird. Aber auch für andere Erreger wurde diese Art der Übertragung nachgewiesen, z.B. für das Louping ill-Virus und *Borrelia burgdorferi* (Randolph et al., 1996).

1.3 NAGER ALS KRANKHEITSÜBERTRÄGER

1.3.1 Systematik

Die Nagetiere (Ordnung Rodentia) sind die artenreichste Ordnung innerhalb der Säugetiere; etwa 40% aller Säugerarten gehören dieser Ordnung an. Die systematische Einteilung der Nager innerhalb der Klasse der Säugetiere ist in Abb. 5 dargestellt, wobei nur diejenigen Arten einbezogen sind, die in der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind.

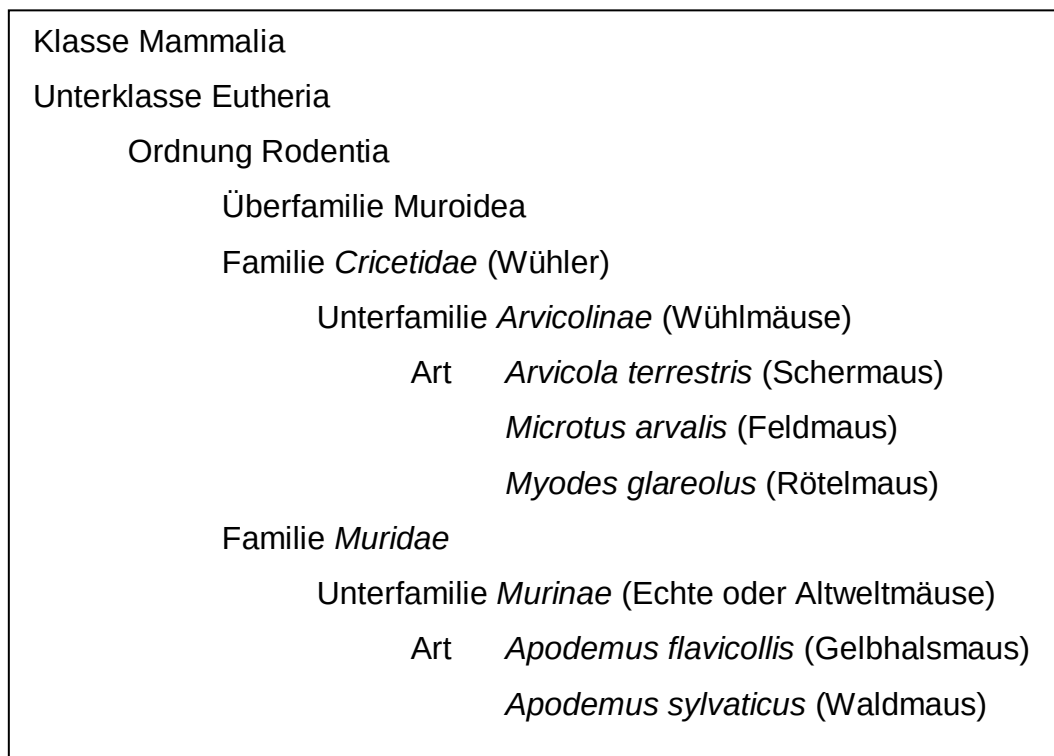


Abb. 5: Systematische Einteilung der Nager (nach Westheide und Rieger, 2004; verändert)

Die systematische Gliederung innerhalb der Rodentia und somit die verwandtschaftlichen Beziehungen der Arten untereinander sind bis heute nicht vollständig geklärt.

1.3.2 Biologie

Nagetiere sind, mit Ausnahme der Antarktis, auf allen Kontinenten verbreitet. Sie stellen die individuenreichste Ordnung innerhalb der Säugetiere dar. Das herausragendste Merkmal aller Arten ist die Umbildung der Schneidezähne zu Nagezähnen, die wurzellos sind und Dauerwachstum aufweisen. Es finden sich

jeweils zwei Nagezähne im Ober- und Unterkiefer (Westheide und Rieger, 2004). Von diesem gemeinsamen Merkmal abgesehen, stellen die Nagetiere eine sehr heterogene Ordnung dar. Sowohl die körperlichen Merkmale als auch die Lebensweisen der einzelnen Arten unterscheiden sich stark. So kommen neben terrestrischen auch subterrane und semiaquatische Arten vor. Die meisten Arten sind reine Pflanzenfresser, daneben existieren jedoch auch omnivore Arten. Nagetiere stellen die Nahrungsgrundlage für zahlreiche Raubtiere dar. Zudem sind sie aufgrund ihrer Lebensweise häufig Nützlinge, die der Bodenbelüftung und -düngung oder der Samenverbreitung dienen. Einige Arten spielen hingegen eine Rolle als Schädlinge in Land- und Forstwirtschaft. Medizinische Bedeutung erlangen viele Nagetiere als Reservoir und Überträger von Krankheitserregern (Essbauer et al., 2008).

Die Muroidea stellen die größte Gruppe innerhalb der Rodentia dar. Sie zeichnen sich durch eine meist kurze Lebensdauer, jedoch starke Vermehrung mit häufig mehreren Würfen pro Jahr aus (Westheide und Rieger, 2004). Im Folgenden werden die Wühlmäuse (*Arvicolinae*) sowie die Echten Mäuse (*Murinae*) näher beschrieben.

1.3.2.1 *Arvicolinae*

Die Wühlmäuse (*Arvicolinae*), die eine holarktische Verbreitung aufweisen, gelten als ursprüngliche Vertreter der Muroidea. Sie besitzen eine gedrungene Erscheinung mit einem plumpen, walzenförmigen Körper, kurzen Beinen und einem stummelförmigen Schwanz; die Ohren sind klein und oft kaum zu sehen. Viele Arten benutzen oberirdische Laufgänge, andere legen ausgedehnte unterirdische Gangsysteme an. Wühlmäuse ernähren sich meist von Pflanzenwurzeln und treten daher häufig als Schädlinge für die Landwirtschaft auf (Dieterlen, 2005b).

Die **Feldmaus** (*Microtus arvalis*, Abb. 6) ist in Deutschland die häufigste und am weitesten verbreitete Säugetierart. In Baden-Württemberg kommt sie flächendeckend vor. Sie zeigt eine gelb-braun-graue Rückenfärbung, während die Körperunterseite gelblich-braun erscheint. Die Schwanzlänge beträgt ca. 30% der Kopf-Rumpf-Länge. Die Augen und Ohren sind sehr klein, die Ohrmuscheln kaum zu sehen. Die Feldmaus bevorzugt offene, nicht zu feuchte Habitate ohne hohe Vegetation. Sie besiedelt daher Wiesen, Weiden und Felder, aber auch Brachland, Heiden und Böschungen. Feldmäuse legen unterirdische Baue an, deren Eingänge durch oberirdische Laufgänge verbunden sind; diese sind in Habitaten mit kurzer

Vegetation sehr gut zu erkennen (Abb. 6). Aufgrund der frühen Geschlechtsreife der Tiere und ihrer hohen Reproduktionsleistung besitzen sie ein sehr großes Fortpflanzungspotential. Feldmaus-Populationen unterliegen in vielen Gebieten drei- bis vierjährigen Populationszyklen (Massenvermehrung mit anschließendem Populationseinbruch). Wenn im Herbst eine sehr hohe, „kritische“ Populationsdichte erreicht ist, bricht die Population im darauffolgenden Winter zusammen. Feldmäuse gelten in der Landwirtschaft als Schädlinge, da sie Fraßschäden bei Klee und Getreide sowie auf Wiesen verursachen können (Dieterlen, 2005a).



Abb. 6: Feldmaus (links; Quelle: de.wikipedia.org) sowie Laufgang und Höhleneingänge (rechts).

Die **Rötelmaus** (*Myodes glareolus*, früher *Clethrionomys glareolus*; Abb. 7) ist von anderen Wühlmaus-Arten durch ihre auffällige rotbraune Färbung gut zu unterscheiden. Sie besitzt einen gedrungenen Körper und eine stumpfer Schnauze. Im Vergleich zur Feldmaus sind ihre Ohren und Augen relativ groß und gut sichtbar. Der Schwanz ist etwa so lang wie die halbe Kopf-Rumpf-Länge und deutlich zweifarbig. Die Rötelmaus ist in Baden-Württemberg flächendeckend verbreitet. Sie besiedelt unterschiedlichste Lebensräume, bevorzugt jedoch solche mit guten Deckungsmöglichkeiten durch Hochstauden, Sträucher und Hecken. Auf Ackerflächen und gemähten Wiesen ist sie hingegen selten zu finden. Rötelmäuse sind gute Kletterer und wurden in Nistkästen in bis zu 3m Höhe gefunden. In Fennoskandinavien (skandinavische Halbinsel und Finnland) werden zyklische Populationsschwankungen von drei bis fünf Jahren beobachtet. In Mitteleuropa treten solche Schwankungen hingegen nicht auf, allerdings kann es in Jahren mit

hohem Nahrungsangebot zu starken Wintervermehrungen kommen. In Jahren mit hoher Populationsdichte kann die Rötelmaus zudem Fraßschäden verursachen und so zum Forstschädling werden (Burkhardt und Schlund, 2005).

Die **Schermaus** (*Arvicola terrestris*; Abb. 7), auch Ostschermaus oder Große Wühlmaus genannt, ist die größte einheimische Wühlmaus Europas. Ihre Kopf-Rumpf-Länge kann bis zu 20cm betragen, ihr Gewicht 300g erreichen. Die Fellfärbung ist sehr variabel, sie reicht von hellem graubraun über schwarzbraun bis hin zu schwarz. Die Körperoberseite ist meist deutlich dunkler gefärbt als die Unterseite. Die Schermaus ist in Baden-Württemberg flächendeckend verbreitet. Sie lebt subterranean in ausgedehnten Gangsystemen und kommt nur selten an die Oberfläche. Bevorzugte Habitate sind Felder, Wiesen und Waldränder, sie kommt aber auch in anderen Lebensräumen vor. Daneben gibt es auch eine semiaquatisch lebende Form, die ihre Baue an Gewässerrändern anlegt und Ein- und Ausgänge unter der Wasseroberfläche nutzt. Wie die Feldmaus besitzt die Schermaus ein sehr großes Fortpflanzungspotential. Auch Massenvermehrungen und Populationsschwankungen treten auf, die in einigen Regionen einem ca. sechsjährigen Zyklus unterliegen. Da sich die Schermaus hauptsächlich von Wurzeln und anderen Pflanzenteilen ernährt, gilt sie in der Landwirtschaft als Schädling, der immense Fraßschäden verursachen kann (Dieterlen, 2005c).



Abb. 7: Rötelmaus (links) und Schermaus (rechts) (Quelle: de.wikipedia.org).

1.3.2.2 *Murinae*

Im Gegensatz zu den Wühlmäusen besitzen die Echten Mäuse (*Murinae*) einen langen Schwanz und lange Hinterfüße sowie große, gut sichtbare Ohren. Der Körper ist schlank, der Schwanz meist unbehaart oder mit wenigen kurzen Haaren versehen und häufig länger als die Kopf-Rumpf-Länge. Neben terrestrischen kommen auch aquatische, amphibische und baumbewohnende Arten vor. Die *Murinae* sind in Eurasien und Afrika in gemäßigten und tropischen Zonen verbreitet. Hausmaus, Haus- und Wanderratte wurden zudem vom Menschen als Neozoen weltweit verschleppt (Dieterlen, 2005b).

Die **Gelbhalsmaus** (*Apodemus flavicollis*, Abb. 8) ist in Baden-Württemberg flächendeckend verbreitet. Sie zeichnet sich durch eine dunkelbraun bis orangefarben gefärbte Körperoberfläche aus, während die Unterseite schneeweiß gefärbt ist. Sie besitzt eine charakteristische gelbe Kehlzeichnung, die meist als durchgehendes Band, seltener als Kehlfleck ausgebildet ist. Gelbhalsmäuse werden bis zu 10cm groß und bis zu 30g schwer; der Schwanz ist fast immer länger als die Kopf-Rumpf-Länge. Ihr bevorzugter Lebensraum befindet sich in Laub- und Mischwäldern mit reicher Laubstreu und geringer Krautschicht sowie in Heckengehölzen. In Mastjahren, in denen im Winter ungewöhnlich viel Nahrung vorhanden ist, kommt es zu Wintervermehrungen und dadurch zu sehr hohen Populationsdichten im darauffolgenden Herbst. Die Gelbhalsmaus trägt als Nützling zur Samenverbreitung bei; Schädwirkungen sind nicht bekannt (Turni, 2005a).

Die **Waldmaus** (*Apodemus sylvaticus*) zeigt ebenfalls flächendeckende Verbreitung in Baden-Württemberg. Ihre äußeren Merkmale ähneln denen der Gelbhalsmaus sehr stark. Die gelbe Kehlzeichnung der Waldmaus ist jedoch nie als durchgehendes Band, sondern nur als Kehlfleck ausgebildet; häufig fehlt die Kehlzeichnung völlig. Die Körperoberseite ist grau-braun gefärbt, die Unterseite schmutzig-weiß. Die Waldmaus ist nicht eng an den Lebensraum Wald gebunden, sondern besiedelt häufig auch offene Landschaften. Das optimale Habitat stellen Waldränder mit Heckengehölzen und benachbarten Feldrainen dar. Auch in Gärten und Parkanlagen ist sie zu finden; Massenvermehrungen sind nicht bekannt. Wie die Gelbhalsmaus spielt auch die Waldmaus keine Rolle als Forstschädling, trägt jedoch zur Samenverbreitung bei (Turni, 2005b).

Wald- und Gelbhalsmaus können häufig in denselben Habitaten gefunden werden. Die morphologische Unterscheidung beider Arten ist häufig schwierig.



Abb. 8: *Apodemus* spp. (Bild: James Lindsey, de.wikipedia.org)

1.3.3 Medizinische Bedeutung

Nager haben große medizinische Bedeutung aufgrund ihrer Rolle als Reservoirwirte und Überträger verschiedener humanpathogener Krankheitserreger. Zudem dienen sie als Wirte für blutsaugende Arthropoden. Daher sind sie an der Bildung von Naturherden entscheidend beteiligt.

Die Übertragung von Krankheitserregern von Nagern auf den Menschen kann auf direktem Weg vonstattengehen, d.h. über den Kontakt zu infizierten Tieren oder deren erregerehaltigen Ausscheidungen. Bei den Hantaviren spielt z.B. die aerogene Infektion, d.h. durch das Einatmen von erregerehaltigen Aerosolen, die vom Urin infizierter Tiere ausgehen, eine wesentliche Rolle. Daneben dienen Nager als Reservoirwirte für eine Reihe von Pathogenen, die indirekt durch blutsaugende Arthropoden auf den Menschen übertragen werden. Beispiele hierfür sind die durch Zecken übertragenen Borrelien und FSME-Viren, aber auch die durch Flöhe übertragenen Pest-Erreger (Essbauer et al., 2008).

1.4 COXIELLA BURNETII

1.4.1 Historisches

Das obligat intrazelluläre Bakterium *Coxiella burnetii* ist der Erreger des weltweit verbreiteten Q-Fiebers. 1935 beschrieb E. H. Derrick erstmals eine fieberhafte Erkrankung unter Schlachthof-Mitarbeitern in Queensland, Australien, die in den folgenden Jahren wiederholt auftrat. Da Derrick den Erreger der Infektion nicht isolieren konnte, bezeichnete er die Erkrankung als „query fever“ (= „Fieber mit unklarer Ursache“) bzw. „Q fever“. Die Australier M. Burnet und M. Freeman infizierten kurze Zeit später Meerschweinchen und Mäuse mit infektiösem Material von Derricks Patienten. In Gewebeschnitten der Tiere charakterisierten sie den unbekannten Erreger als rickettsienartig. Parallel dazu gelang es H. R. Cox 1938 in Montana, USA, ein aus Zecken isoliertes, bisher unbekanntes Bakterium in embryonierten Hühnereiern anzuzüchten. Dieser „Nine Mile strain“ wies dieselben Eigenschaften auf wie der von Burnet und Freeman untersuchte Q-Fieber-Erreger. Zudem zeigte ein Mitarbeiter von Cox nach einer Laborinfektion mit dem „Nine Mile strain“ Symptome einer fieberhaften Erkrankung, die denen des australischen Q-Fiebers entsprachen. Die in Australien und den USA beschriebenen Bakterien wurden daraufhin als Isolate desselben Erregers charakterisiert. Zudem wurde auf diese Weise eine Verbindung zwischen der humanen Erkrankung und dem Vorkommen des Bakteriums in der Natur hergestellt. Zu Ehren der beiden Hauptentdecker Cox und Burnet wurde der Erreger 1938 als *Coxiella burnetii* bezeichnet (Derrick, 1944; Maurin und Raoult, 1999; Cutler et al., 2007).

In den letzten Jahren gewann *C. burnetii* zunehmend an Bedeutung, da der Erreger als biologischer Kampfstoff der Kategorie B eingestuft wird; dies führte in vielen Bereichen zu einer Intensivierung der Forschungsarbeit (Madariaga et al., 2003).

Obwohl *C. burnetii* als Erreger des Q-Fiebers seit über 70 Jahren bekannt ist, gibt es besonders bezüglich der Epidemiologie und Übertragung des Erregers weiterhin Unklarheiten, die weitere intensive Untersuchungen erfordern.

1.4.2 Systematik und Biologie

C. burnetii wird der Ordnung Legionellales innerhalb der γ -Proteobakterien zugeordnet. Die etwa 0,3-1,0 μm großen, pleomorphen, stäbchenförmigen Bakterien sind obligat intrazellulär; Makrophagen stellen die Haupt-Wirtszellen dar. Zudem

können die Erreger sporenähnliche Körperchen ausbilden, die ein Überleben in der Umwelt ermöglichen (Fournier et al., 1998; Raoult et al., 2005).

Coxiellen besitzen ein ringförmiges Chromosom mit einer Genomgröße von 1,5-2,4Mb; zusätzlich sind bei einigen Stämmen Plasmide vorhanden. *C. burnetii* besitzt 29 repetitive Elemente, die jeweils in vielfacher Kopie im Genom vorhanden sind. Das IS1111-Element, das Transposase-Aktivität aufweist, liegt beispielsweise in 21 Kopien vor (Seshadri et al., 2003; Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005).

Die vegetative, intrazelluläre Form des Bakteriums, die auch als „large cell variant“ (LCV) bezeichnet wird, ähnelt den gramnegativen Bakterien; sie ist metabolisch aktiv. Ausgehend von dieser Form werden sporenähnliche Körperchen, sogenannte „small cell variants“ (SCV) gebildet (Abb. 9). Diese hochinfektiösen Stadien sind metabolisch inaktiv und sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung und Austrocknung. Sie können daher in der Umwelt über mehrere Wochen oder Monate infektiös bleiben (Maurin und Raoult, 1999).



Abb. 9: Vegetative Form (LCV) von *C. burnetii*. Am oberen Ende ist die Bildung eines sporenähnlichen Körperchens (SCV) zu sehen. Sp: sporenähnliches Körperchen. (Bild: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wilkins, Vol. 1; illustriert von C. Lüttich, Gera; verändert)

C. burnetii zeigt bei der Ausbildung der Lipopolysaccharid (LPS)-Membran eine Phasenvariation, die der LPS-Veränderung der Enterobakterien ähnelt. Bakterien, die sich in Phase I befinden, besitzen eine komplette LPS-Schicht und sind virulent. Phase II-Bakterien dagegen bilden, vermutlich aufgrund veränderter Genexpression, eine LPS-Membran aus, der bestimmte verzweigte Zuckermoleküle (Virenose und Dihydrohydroxystreptose) fehlen. Aufgrund dieser Veränderung besitzen die Phase II-Formen der Coxiellen nur eine geringe Virulenz (Raoult et al., 2005). Die aus Patienten isolierten Coxiellen zeigen immer die Phase I-Form, wohingegen nach mehrfachen Passagen von *C. burnetii* in Zellkultur oder embryonierten Hühnereiern Bakterien der Phase II isoliert werden können (Madariaga et al., 2003). Die beiden Formen sind morphologisch nicht zu unterscheiden, können jedoch serologisch differenziert werden, da sie die Produktion unterschiedlicher Antikörper auslösen. Diese Eigenschaft spielt in der Humandiagnostik eine entscheidende Rolle bei der serologischen Differenzierung zwischen akutem Q-Fieber und der chronischen Form der Erkrankung, die sich bei einem kleinen Teil der Patienten aus der akuten Form entwickelt. Während bei akutem Q-Fieber vor allem Antikörper gegen Phase II gebildet werden, herrschen bei chronischem Q-Fieber Antikörper gegen Phase I vor.

Die SCV der Coxiellen dringen durch Phagozytose in ihre Wirtszellen ein; dabei unterscheiden sich bei Bakterien der Phasen I und II die beteiligten Rezeptoren. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin der Wirtszellmembran erfüllt für beide Formen eine entscheidende Funktion; an der Aufnahme der avirulenten Phase II-Formen ist zusätzlich der Komplement-Rezeptor CR3 beteiligt (Capo et al., 1999). Die Phagozytose der avirulenten Phase II-Bakterien verläuft schneller und effektiver als diejenige der virulenten Phase I-Formen. Gleichzeitig sind Makrophagen jedoch in der Lage, die in Phase II befindlichen Erreger zu eliminieren, während dies für Phase I-Formen nicht möglich ist (Capo et al., 1999).

Nach der Aufnahme in die Wirtszelle wandeln sich die SCV im Phagosom, das einen pH-Wert von etwa 5,5 aufweist, zu LCV um. Das saure Milieu ist für das Überleben und die Vermehrung der Erreger notwendig (Heinzen et al., 1996). Die Verschmelzung von Phago- und Lysosomen zu Phagolysosomen wird durch *C. burnetii* verzögert, bis die Umwandlung zu LCV abgeschlossen ist (Howe und Mallavia, 2000). In einem späteren Stadium können mehrere dieser Phagolysosomen zu großen, erregerhaltigen Vakuolen mit einem pH-Wert von 4,7-

5,2 verschmelzen. Die Bildung der infektiösen SCV, die anschließend aus den Zellen freigesetzt werden, findet ebenfalls bei niedrigem pH-Wert statt (Fournier et al., 1998). Abb. 10 zeigt mit *C. burnetii* infizierte BGM-Zellen (Buffalo green monkey cells = Affennierenzellen), die an den großen erregerrhaltigen Vakuolen deutlich zu erkennen sind. Aufgrund der geringen Infektionsdosis von *C. burnetii* (ein einzelnes Bakterium ist für eine Infektion ausreichend) ist für die Anzucht des Erregers in der Zellkultur ein Labor der Sicherheitsstufe L3 erforderlich (Madariaga et al., 2003; Raoult et al., 2005).

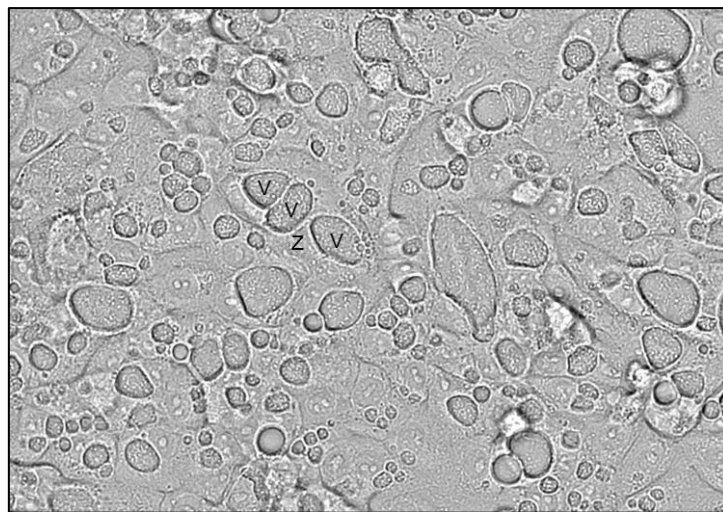


Abb. 10 Mit *C. burnetii* infizierte BGM-Zellen. Zu sehen sind die großen erregerrhaltigen Vakuolen (V), die sich in infizierten Zellen (Z) bilden (Bild: Dr. Silke Fischer und Dr. Rainer Oehme, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg).

1.4.3 Q-Fieber

Humane Infektionen mit *C. burnetii* sind vor allem auf Inhalation infektiöser Aerosole zurückzuführen, wobei Schafe die Hauptinfektionsquelle darstellen. Seltener sind alimentäre Infektionen durch den Verzehr von roher Milch. Die Inkubationszeit beträgt etwa 20 Tage (Fournier et al., 1998).

Akute Q-Fieber-Erkrankungen bleiben in den meisten Fällen (bis zu 60%) symptomlos, können sich aber auch als selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung äußern (ca. 38%), zu deren Hauptsymptomen Fieber, starke retroorbitale Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Abgeschlagenheit, Muskel- und Gelenkschmerzen zählen. In etwa 2% aller Fälle kommt es zu einer schweren akuten Infektion, die sich vor allem durch atypische Pneumonie oder Hepatitis äußert. Daneben treten in

seltenen Fällen andere Manifestationen wie Myokarditis oder Meningitis auf. Ungefähr 0,2% der Patienten entwickeln ein chronisches Q-Fieber, das in den meisten Fällen zu einer Endokarditis führt. Patienten mit bereits bestehenden Herzklappenerkrankungen sind hiervon besonders häufig betroffen (Raoult et al., 2005). Bei Schwangeren verlaufen akute Q-Fieber-Infektionen häufig asymptomatisch und werden daher vermutlich in vielen Fällen nicht diagnostiziert. Infektionen im ersten Trimenon können jedoch zu Fehlgeburten führen. Durch Q-Fieber-Erkrankungen im zweiten oder dritten Trimenon kommt es dagegen häufig zu Frühgeburten oder geringem Geburtsgewicht des Neugeborenen. Zudem haben Schwangere ein deutlich erhöhtes Risiko, an chronischem Q-Fieber zu erkranken (Carcopino et al., 2009; Denman und Woods, 2009).

Zur Diagnostik des Q-Fiebers werden vor allem serologische Methoden (ELISA, indirekter Immunfluoreszenztest, Komplementbindungsreaktion) angewendet. Akutes Q-Fieber zeichnet sich durch einen hohen IgG-Antikörper-Titer gegen Phase II-Antigen aus, während für das chronische Q-Fieber ein hoher IgG-Antikörper-Titer gegen Phase I-Antigen charakteristisch ist (Kimmig und Wagner-Wiening, 2009).

Für die Behandlung des akuten Q-Fiebers wird eine Behandlung mit Doxycyclin über 7-14 Tage empfohlen. Bei chronischem Q-Fieber ist eine mindestens 18 Monate dauernde Therapie mit Doxycyclin in Kombination mit Hydroxychloroquin erforderlich. Durch das Hydroxychloroquin wird der pH-Wert in den Phagolysosomen erhöht, wodurch die bakterizide Wirkung des Doxycyclins verstärkt wird (Madariaga et al., 2003).

C. burnetii-Infektion bei Tieren verlaufen in der Regel asymptomatisch, es treten jedoch auch Pneumonien auf. Bei trächtigen Schafen und Ziegen kann die Infektion zu Aborten und Totgeburten führen; zudem können missgebildete Föten auftreten. Rinder erkranken häufig an einer Metritis (Entzündung der Gebärmutter), die zur Infertilität der Tiere führen kann. Über eine Infektion des Euters können die Erreger zudem in die Milch übergehen (Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005).

Für die Anwendung beim Tier sind Q-Fieber-Impfstoffe entwickelt worden, die meist aus inaktivierten Phase I-Bakterien bestehen. Sie reduzieren die Ausscheidung der sporenähnlichen Körperchen und somit die Kontamination der Umgebung, was wiederum zu einer reduzierten Infektionsgefahr für den Menschen führt. In geringem

Maße scheiden die Tiere jedoch auch nach der Impfung noch Erreger aus (Arricau-Bouvery und Rodolakis, 2005). An der Entwicklung eines Impfstoffs für den Menschen wird ebenfalls seit langem gearbeitet. In Australien wurden im Rahmen einer Impfkampagne Schlachthofmitarbeiter gegen Q-Fieber immunisiert. Die Zahl der *C. burnetii*-Infektionen unter den Mitarbeitern konnte auf diese Weise deutlich reduziert werden (Marmion, 2007).

In Deutschland sind für den Menschen bisher keine Q-Fieber-Impfstoffe zugelassen. Für Schafe, Ziegen und Rinder sind Impfstoffe vorhanden; die Vakzinierung wird zur Prophylaxe von Q-Fieber-Ausbrüchen empfohlen (Fischer et al., 2010).

1.4.4 Epidemiologie

C. burnetii zeichnet sich neben einer komplexen Lebensweise, welche die Bildung von sporenähnlichen Körperchen sowie Phasenvariationen in der LPS-Membran beinhaltet, durch eine ebenso komplexe Epidemiologie mit zahlreichen Übertragungswegen aus. Generell wird die Erkrankung als Zoonose von Tieren auf den Menschen übertragen, wobei *C. burnetii* neben Säugetieren auch Vögel und Arthropoden infizieren kann (Maurin und Raoult, 1999; Arricau-Bouvery, 2005).

In den 1970er Jahren entwickelte Liebisch ein detailliertes Schema der Epidemiologie und Übertragungswege von *C. burnetii* (Liebisch, 1977). Er ging davon aus, dass die Bakterien in einem basalen („haploxyenischen“) Zyklus von Zeckenlarven und -nymphen auf Nager und andere kleine Säugetiere übertragen werden. Diese Zirkulation bezeichnete Liebisch als Naturherd (Abb. 11). Grundsätzlich können über 40 Zeckenarten mit Coxiellen infiziert sein (Kazar et al., 2005); in Deutschland spielen wohl Zecken der Gattung *Dermacentor* die größte Rolle. Durch die adulten Zecken, die größere Wirtstiere befallen, werden die Erreger mit dem Zeckenkot auf Wild- und Haustiere übertragen, vor allem Rotwild, Ziegen und Schafe (Liebisch, 1977). Infizierte Säugetiere scheiden mit Kot und Urin, vor allem aber mit Geburtsflüssigkeiten enorme Mengen der hochinfektösen sporenähnlichen Körperchen aus und kontaminieren auf diese Weise ihre Umgebung. Dies ist die Grundlage für die Übertragung der Erreger ohne Beteiligung eines Vektors, was Liebisch als „hemixenischen Zyklus“ bezeichnete. Dabei infizieren sich Tiere und Menschen durch Inhalation von erregerhaltigen Aerosolen, welche die sporenähnlichen Körperchen enthalten. Heiße, trockene

Wetterbedingungen sowie Wind erleichtern die Verbreitung der infektiösen Stadien und erhöhen somit das Infektionsrisiko (Liebisch, 1977).

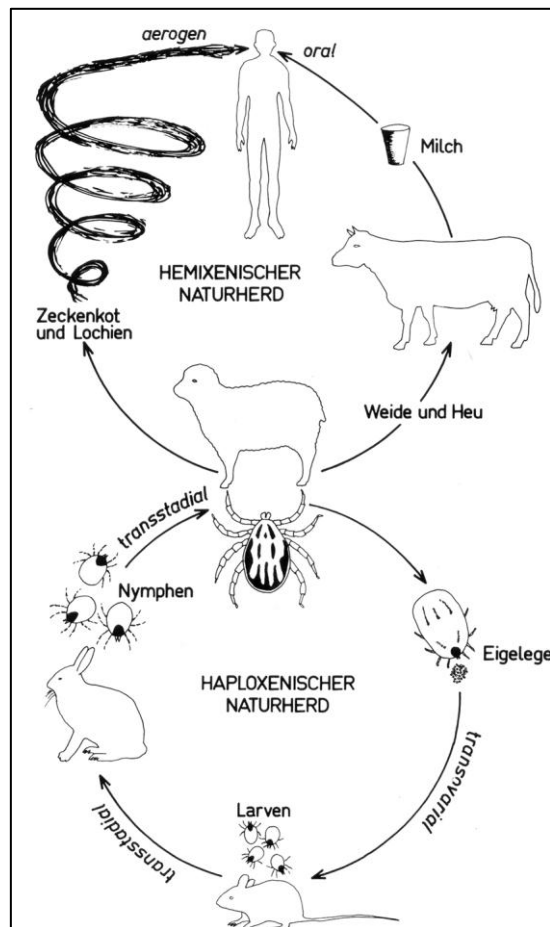


Abb. 11: Zirkulation von *Coxiella burnetii* in Naturherden (Liebisch, 1977).

1.4.5 Verbreitung

Das Q-Fieber ist eine weltweit verbreitete Zoonose (Maurin und Raoult, 1999); lediglich in Neuseeland wurde sie bisher nicht nachgewiesen (Hilbink et al., 1993; Greenslade et al., 2003). Sporadische Q-Fieber-Infektionen treten vor allem bei Schäfern, Tierärzten und anderen Personen mit direktem Kontakt zu infizierten Tieren auf. Daneben kommt es immer wieder zu größeren Q-Fieber-Ausbrüchen, bei denen oft mehrere hundert Personen erkranken. Meist können dabei infizierte Schafe, die ihre Umgebung mit sporenähnlichen Körperchen kontaminieren, als Infektionsquelle identifiziert werden. Aufgrund der bereits beschriebenen unspezifischen Symptomatik des Q-Fiebers ist davon auszugehen, dass die „Dunkelziffer“ der Infektionen deutlich höher ist als die Zahl der tatsächlich

gemeldeten Infektionen (Fournier et al., 1998). Tab. 2 gibt einen Überblick über einige Q-Fieber-Ausbrüche in den letzten 15 Jahren.

Tab. 2: Q-Fieber-Ausbrüche der letzten 15 Jahre, weltweit

Land	Erkrankte	Jahr	Infektionsquelle	Literatur
Bulgarien	220	2004	Schafe/Ziegen	Panaiotov et al., 2009
Frankreich	29	1996	Schafe	Armengaud et al., 1997
Großbritannien	30	2007	Schafe	Wallenstein et al., 2010
Italien	65	2003	Schafe	Starnini et al., 2005
Niederlande	96	2008	Ziegen	Schimmer et al., 2010
Slowenien	35	2007	Schafe	Grilc et al., 2007
Kanada	66	1999	Ziegen	Hatchette et al., 2001
USA	20	2005	Ziegen	Bamberg et al., 2007

In Deutschland wurde 1947/48 erstmals über Q-Fieber-Ausbrüche in ländlichen Regionen berichtet; es wird angenommen, dass der Erreger mit Viehtransporten eingeschleppt wurde (Hellenbrand et al., 2001). Die Erkrankung ist in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Bundesweit erkrankten in den Jahren 2001-2008 durchschnittlich 258 Personen jährlich an Q-Fieber; Baden-Württemberg ist mit 59 Erkrankungen pro Jahr am stärksten betroffen (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>). In Abb. 12 sind die von 2001-2010 jährlich gemeldeten humanen Q-Fieber-Erkrankungen in Deutschland und Baden-Württemberg dargestellt. Die Meldungen enthalten sowohl sporadische Erkrankungen als auch Infektionen, die im Rahmen von Ausbrüchen erworben werden. Da die Anzahl und das Ausmaß von Q-Fieber-Ausbrüchen jedoch sehr stark schwanken, zeigen sich in den einzelnen Jahren starke Unterschiede in der Zahl der gemeldeten Infektionen. Beispielsweise wurden im Jahr 2005 416 Q-Fieber-Fälle gemeldet, von denen 331 auf einen großen Ausbruch in Jena zurückgingen (siehe auch Tab. 3). Entsprechendes gilt für das Jahr 2003, in dem ein Großteil der Q-Fieber-Erkrankungen im Rahmen eines Ausbruchs in Soest auftrat.

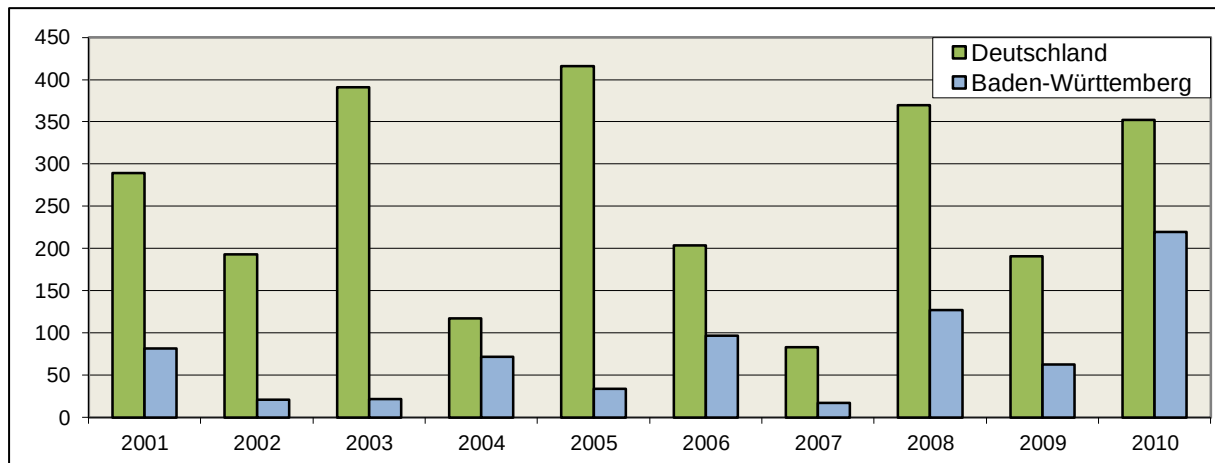


Abb. 12: Q-Fieber-Fälle in Deutschland (grün) und Baden-Württemberg (blau), 2001-2010 (Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>. Datenstand: 18.1.2011).

Tab. 3 gibt einen Überblick über einige Q-Fieber-Ausbrüche in Deutschland in den letzten 15 Jahren.

Tab. 3: Q-Fieber-Ausbrüche der letzten 15 Jahre, Deutschland

Jahr	Ort	Bundesland	Erkrankte	Infektionsquelle	Literatur
1996	Lohra-Rollshausen	Hessen	49	Schafe	Lyytikäinen et al., 1997
1997	Gießen	Hessen	77	Schafe	RKI, 1997a
1997	Herrenberg	Baden-Württemberg	12	Damwild	RKI, 1997b
1998	Freiburg	Baden-Württemberg	72	Schafe	RKI, 1998
1999	Dortmund	Nordrhein-Westfalen	60	Schafe	RKI, 1999
1999	Miltenberg	Bayern	36	Schafe	RKI, 1999
1999	Rottweil	Baden-Württemberg	22	Schafe	RKI, 1999
2001	Hallenberg	Nordrhein-Westfalen	73	Schafe	RKI, 2001
2003	Soest	Nordrhein-Westfalen	299	Schafe	Porten et al., 2006
2005	Jena	Thüringen	331	Schafe	Gilsdorf et al., 2008
2008	Aschaffenburg	Bayern	37	Schafe	RKI, 2008
2008	Lahn-Dill-Kreis	Hessen	45	Schafe	RKI, 2008

1.5 *RICKETTSIA* SPP.

1.5.1 Historisches

Erkrankungen, die durch Bakterien der Gattung *Rickettsia* hervorgerufen werden, gehören zu den am längsten bekannten Krankheitsbildern der Menschheit. Bereits im 5. Jahrhundert v. Chr. beschrieb Thukydides den Ausbruch einer Fleckfieber-Erkrankung in Athen, bei der es sich nach heutiger Kenntnis wohl um das durch *Rickettsia prowazekii* verursachte Fleckfieber handelte. Somit zählen die Rickettsiosen zu den am längsten bekannten Infektionskrankheiten des Menschen (zitiert in Raoult und Roux, 1997).

Die Entdeckung neuer Rickettsiosen und die Aufklärung der zugehörigen Übertragungswege zogen sich oft über Jahrzehnte hin. So wurde z.B. das Rocky Mountain Spotted Fever 1899 erstmals von Edward E. Maxey beschrieben. Doch erst sieben Jahre später entdeckte Howard T. Ricketts, dass Zecken für die Übertragung des Erregers *Rickettsia rickettsii* verantwortlich sind. Dies wurde ein paar Jahre später, 1919, von S. Burt Wolbach bestätigt. Ähnlich verlief die Entdeckung des Mittelmeerfleckfiebers. Über die erste Erkrankung wurde bereits 1910 aus Tunis berichtet; *R. conorii* als Erreger dieser Erkrankung wurde jedoch erst in den 1930er Jahren identifiziert, ebenso die Rolle der Braunen Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus* als Überträger dieses Pathogens (Parola et al., 2005). Die Pioniere der frühen Rickettsien-Forschung bezahlten ihren Forscherdrang nicht selten mit dem Leben. So starben sowohl Ricketts als auch Von Prowazek an Epidemischem Fleckfieber, dessen Erreger *Rickettsia prowazekii* sie untersuchten (Raoult und Roux, 1997)

Die großen Fortschritte in der Forschung in den letzten 30 Jahren, vor allem die Entwicklung und Verbesserung molekularbiologischer Methoden, ermöglichten eine intensive Suche nach neuen Rickettsien-Arten. Dies trug wesentlich dazu bei, dass allein von 1984 bis 2005 elf neue humanpathogene Rickettsienarten oder -unterarten entdeckt wurden (Parola et al., 2005).

Die Entdeckung und Charakterisierung neuer Rickettsienarten, -unterarten und -stämme sowie die Aufklärung epidemiologischer Fragestellungen beschäftigt die Forschung bis heute.

1.5.2 Systematik

Rickettsien sind α -Proteobakterien, die systematisch zur Familie *Rickettsiaceae* innerhalb der Ordnung *Rickettsiales* gehören. Zu dieser Ordnung zählt auch die Familie *Anaplasmataceae* mit den human- bzw. tierpathogenen Arten *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. und *Neorickettsia* spp.

Ursprünglich wurden die Rickettsien in drei Gruppen unterteilt: die Zeckenstichfieber-Gruppe („spotted fever group“, SFG), die Fleckfieber-Gruppe („Typhus group“, TG) und die Tsutsugamushi-Gruppe („scrub typhus group“). Die Vertreter der Fleckfieber-Gruppe, zu der der Erreger des Epidemischen Fleckfiebers (*R. prowazekii*) sowie der Erreger des murinen Fleckfiebers (*R. typhi*) gehören, werden durch Läuse bzw. Flöhe übertragen. Die Erreger der Zeckenstichfieber-Gruppe werden hingegen durch Zecken übertragen. Trotz abweichender Vektoren werden die durch Milben übertragene Art *R. akari* sowie die durch Flöhe übertragene Art *R. felis* traditionell ebenfalls zur Zeckenstichfieber-Gruppe gezählt (Raoult und Roux, 1997 CMR). Der einzige Vertreter der Tsutsugamushi-Gruppe, *Rickettsia tsutsugamushi*, wurde aufgrund von DNA-Untersuchungen in die Ordnung *Orientia* verschoben (Tamura et al., 1995).

Durch umfangreiche molekularbiologische und phylogenetische Untersuchungen ist die Unterteilung innerhalb der Gattung *Rickettsia* in den letzten Jahren komplexer geworden (Abb. 13). So zeigten DNA-Untersuchungen, dass *R. akari* und *R. felis* innerhalb des Rickettsien-Stammbaums ein eigenes Cluster bilden, das als Übergangsgruppe („transitional group“) bezeichnet wird. Die phylogenetische Position außerhalb der Zeckenstichfieber-Gruppe spiegelt nun auch die Übertragung dieser Bakterien durch abweichende Vektoren wider. Die nicht-pathogenen Arten *R. bellii* und *R. canadensis* bilden die sogenannte Ahnen-Gruppe („ancestral group“) (Gillespie et al., 2007).

In einigen neueren Studien wurden in die phylogenetischen Untersuchungen auch Rickettsienarten einbezogen, die als Symbionten in nicht blutsaugenden Arthropoden wie Käfern oder in wirbellosen Tieren wie Blutegeln leben. Dementsprechend werden die Rickettsien in diesen Arbeiten in eine weit größere Zahl von Gruppen unterteilt (Perlman et al., 2006; Weinert et al., 2009).

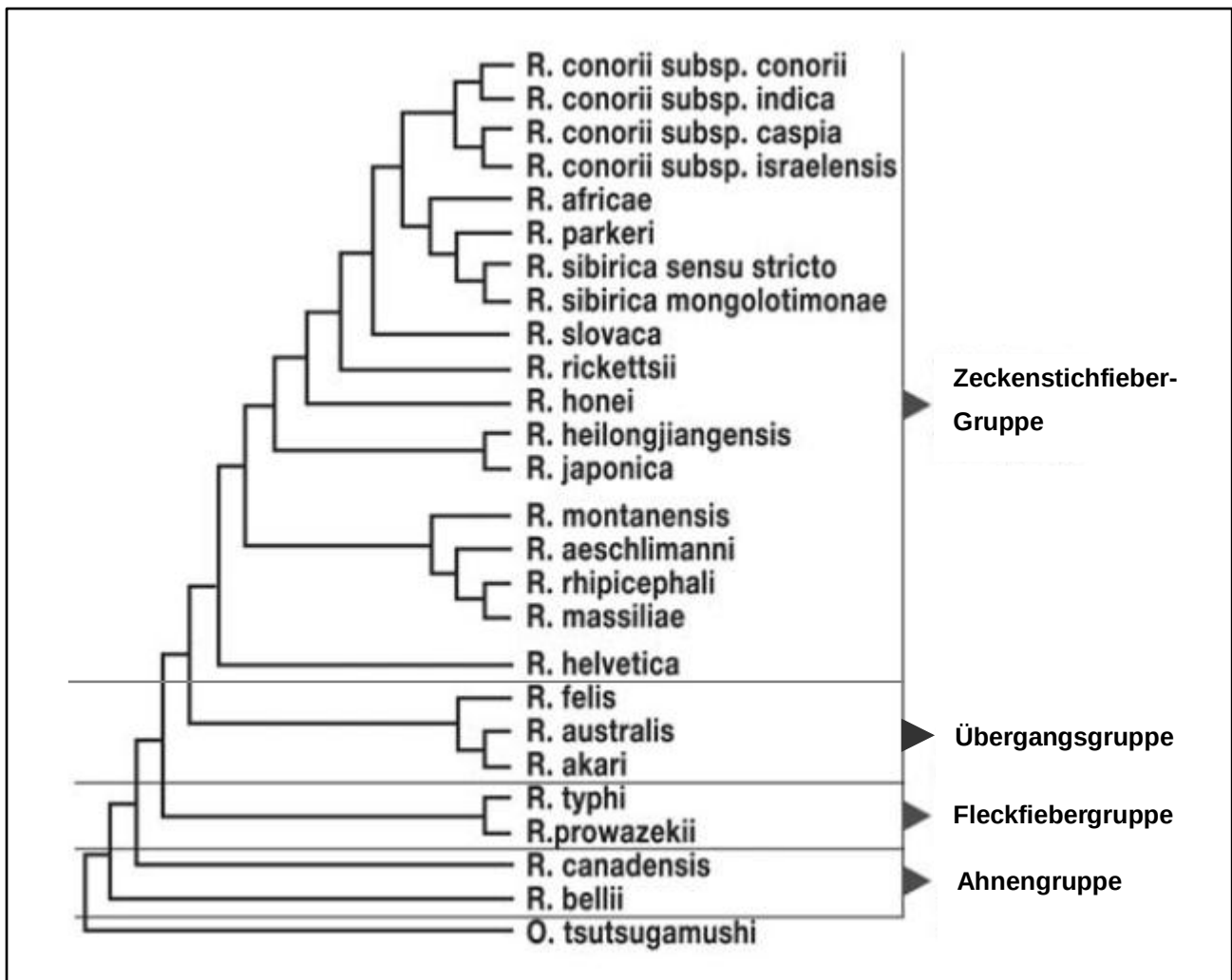


Abb. 13: Stammbaum der Rickettsien (Dobler und Wölfel, 2009; verändert)

1.5.3 Verbreitung

Rickettsien sind weltweit verbreitet. Das Vorkommen der einzelnen Arten hängt im Wesentlichen von der Verbreitung der sie übertragenden Vektoren ab. Tab. 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten humanpathogenen Rickettsien, ihre Vektoren und ihre geographische Verbreitung sowie die zugehörigen Krankheitsbilder.

Tab. 4: Humanpathogene Rickettsienarten und deren Vektoren sowie zugehörige Krankheitsbilder und geographische Verbreitung (verändert nach Mediannikov et al., 2008; Dobler und Wölfel, 2009).

Rickettsienart	Erkrankung	Vektoren	Verbreitung
Fleckfieber-Gruppe			
<i>R. prowazekii</i>	Epidemisches Fleckfieber	Kleiderläuse	Afrika, Asien, Zentral- und Südamerika
<i>R. typhi</i>	Murines/Endemisches Fleckfieber	Flöhe	weltweit
Zeckenstichfieber-Gruppe			
<i>R. africae</i>	Afrikanisches Zeckenstichfieber	<i>Amblyomma</i> spp.	Subsahara-Afrika, Karibik
<i>R. australis</i>	Queensland Flecktyphus	<i>Ixodes</i> spp.	Australien, Tasmanien
<i>R. conorii</i>	Mittelmeerfleckfieber	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Mittelmeerregion, Mittlerer Osten, Indien
<i>R. helvetica</i>	Aneruptives Zeckenstichfieber	<i>Ixodes ricinus</i>	Eurasien
<i>R. honei</i>	Flinders Island-Zeckenstichfieber; Thailand-Zeckenstichfieber	Zecken	Australien, Thailand
<i>R. japonica</i>	Östliches Zeckenstichfieber	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Japan
<i>R. massiliae</i>	Zeckenstichfieber	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Europa
<i>R. monacensis</i>	Zeckenstichfieber	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa
<i>R. raoultii</i>	Zeckenstich-Lymphadenitis (TIBOLA)	<i>Dermacentor</i> spp.	Europa, Russland
<i>R. rickettsii</i>	Rocky Mountain Zeckenstichfieber	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp., <i>Ixodes</i> spp.	Amerika
<i>R. sibirica</i>	Nordasiatisches Zeckenstichfieber	Zecken	Russland, China, Mongolei
<i>R. slovaca</i>	Zeckenstich-Lymphadenitis (TIBOLA)	<i>Dermacentor</i> spp.	Eurasien
Übergangsgruppe			
<i>R. akari</i>	Rickettsienpocken	Milben	vermutlich weltweit
<i>R. felis</i>	Floh-Fleckfieber	Flöhe	vermutlich weltweit

1.5.4 Biologie

Rickettsien sind gram-negative, kurze, stäbchenförmige bis kokkoide Bakterien mit einer Länge von 0,8-2µm und einem Durchmesser von 0,3-0,5µm (La Scola und Raoult, 1997). Sie leben obligat intrazellulär, wobei die Endothelzellen kleiner und mittlerer Blutgefäße ihre wichtigsten Wirtszellen darstellen (Parola et al., 2005) (Abb. 14).



Abb. 14: *Rickettsia* spp. beim Eindringen in eine Wirtszelle (Bild: Dr. E. Ewing, CDC; <http://phil.cdc.gov>)

Um den Eindringvorgang in die Wirtszelle zu induzieren, bindet *Rickettsia* spp. zunächst an Proteinrezeptoren auf der Oberfläche der Zelle. Die dafür verantwortlichen Proteine auf der Bakterienoberfläche sind bisher nur für einzelne Rickettsienarten identifiziert; bei *R. rickettsii* scheint beispielsweise das Oberflächenprotein rOmpA eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Bindung an den Rezeptor löst eine Veränderung im Zytoskelett der Wirtszelle aus, was zum Eintritt des Erregers mittels Endozytose führt. Das Phagosom wird durch das Bakterium aufgelöst, bevor es zur Bildung von Phagolysosomen kommt. Auf diese Weise entgeht der Erreger einer Zerstörung durch lysosomale Enzyme (Walker et al., 2003). Die Bakterien liegen frei, d.h. nicht von einer Vakuole umschlossen, im Zytoplasma der Zellen. Vertreter der Zeckenstichfieber-Gruppe können sich durch Aktin-Polymerisation innerhalb der Zelle bewegen und daher auch in den Zellkern

eindringen. Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe kommen dagegen ausschließlich im Zytoplasma vor (Raoult und Roux, 1997).

Rickettsien werden ausschließlich von Arthropoden übertragen. Prinzipiell kommen Zecken, Milben, Flöhe und Läuse als Vektoren in Frage. Bei vielen Rickettsienarten stellen die Vektoren zugleich das wichtigste Erregerreservoir dar, da sich die Bakterien in ihnen stark vermehren. Sowohl die durch Zecken und Milben als auch die durch Flöhe übertragenen Arten werden transovariell, d.h. vom adulten Weibchen über die Eier an die Larven, weitergegeben; bei der durch Läuse übertragenen Art *R. prowazekii* ist diese Art der Übertragung hingegen ausgeschlossen. Die zeckenübertragenen Rickettsien werden zudem transstadial übertragen; damit können alle Zeckenstadien als Vektoren dienen (Raoult und Roux, 1997; Azad und Beard, 1998).

Im Gegensatz zur Rolle der Arthropoden ist die Rolle von Vertebraten im Lebenszyklus der Rickettsien und bei der Aufrechterhaltung von Naturherden noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Rickettsien verschiedene Tierarten als Reservoirwirte nutzen. Hierzu zählen unter anderem Nager, Hasenartige, Hunde und Hirsche (Azad und Beard, 1998; Raoult und Roux, 1997). Allerdings gibt es kaum Studien über die tatsächliche Verbreitung der Erreger in Wildtieren. Solche Studien existieren zudem nur für sehr wenige Rickettsien- und Wirtstierarten.

Neben einer Reihe humanpathogener Arten gibt es auch Rickettsienarten, die für den Menschen nicht pathogen sind, bzw. deren Pathogenität bisher nicht geklärt ist (Raoult und Roux, 1997). Einige Arten, die lange Zeit als nicht humanpathogen galten, wurden inzwischen jedoch mit humanen Erkrankungsfällen in Verbindung gebracht. Dies gilt u.a. für *R. raoultii* (Parola et al., 2009) und *R. helvetica* (Nilsson et al., 1999b). Einige Autoren gehen sogar davon aus, dass alle Rickettsienarten humanpathogen sein können, sofern ihre Vektoren in der Lage sind, am Menschen Blut zu saugen (La Scola und Raoult, 1997).

1.5.5 Rickettsien als Krankheitserreger

Über zwanzig Arten von Rickettsien wurden bis heute als Erreger humaner Rickettsiosen identifiziert. Je nachdem, welche Rickettsienart für die Infektion verantwortlich ist, unterscheiden sich Verlauf und Symptome der Rickettsiosen. Infektionen können mild und komplikationslos verlaufen oder zu schweren,

lebensbedrohlichen Erkrankungen führen (Parola et al., 2005). Der Beginn der Infektion ähnelt sich jedoch bei allen Rickettsiosen. Nach der Übertragung der Rickettsien auf den Wirt vermehren sich die Bakterien zunächst lokal in Endothelzellen in der Nähe der Einstichstelle. Dabei werden die Zellen zerstört, was zu Hautnekrosen im Bereich der Stichstelle führt. Diese werden je nach Rickettsienart als eschar oder „Tache noir“ bezeichnet. Die weitergehende Vermehrung der Erreger führt zu Vaskulitis und einem typischen makulopapulösen Hautausschlag, der charakteristisch für fast alle Rickettsiosen ist (Martinez und Cossart, 2004). Weitere typische Symptome einer Rickettsien-Infektion sind Fieber, Kopfschmerz, Muskelschmerz sowie lokale Lymphknotenschwellung. Bei einigen Rickettsienarten kommt es im weiteren Krankheitsverlauf zu einer Erregergeneralisation. Dabei werden die Bakterien mit dem Blut oder der Lymphflüssigkeit im gesamten Körper verbreitet und können innere Organe, vor allem Lunge, Leber, Milz, Nieren und Herz, befallen (Martinez und Cossart, 2004). Die Zerstörung von Blutgefäßen in den betroffenen Organen kann zu schweren inneren Blutungen und somit zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsbild führen. Rickettsien-Infektionen werden mit intrazellulär wirksamen Antibiotika behandelt. Für alle zeckenübertragenen Rickettsiosen ist Doxycyclin das Mittel der Wahl (Parola et al., 2005).

Im Folgenden werden drei in Deutschland endemische Rickettsienarten und die zugehörigen Erkrankungen näher beschrieben.

Rickettsia slovaca wurde 1969 in der Tschechoslowakei zum ersten Mal aus *Dermacentor marginatus* isoliert und 1978 als neue Art beschrieben (zitiert in Sekeyova et al., 1998). Lange Zeit wurde angenommen, dass *R. slovaca* für den Menschen nicht pathogen ist. 1997 konnten Raoult et al. den Erreger jedoch in einem Patienten mit einer fieberhaften Erkrankung nach einem Zeckenstich sowohl molekularbiologisch als auch serologisch nachweisen. Cazorla et al. (2003) konnten *R. slovaca* aus einer Hautbiopsie einer Patientin aus Frankreich isolieren und im Labor auf Zellkultur anzüchten und somit die Pathogenität bestätigen. Auch in anderen Ländern Europas wurden in den letzten Jahren symptomatische *R. slovaca*-Infektionen beschrieben, u.a. in Italien (Selmi et al., 2008) und Ungarn (Lakos, 2002). Aufgrund des Hauptsymptoms, einer schmerzhaften Schwellung der Lymphknoten im Bereich des Zeckenstichs, wird die Erkrankung als zeckenübertragene

Lymphadenitis (engl. tick-borne lymphadenopathy, TIBOLA) bezeichnet (Lakos, 1997). Als weitere Symptome treten ein eschar und/oder Erythem im Bereich des Zeckenstichs, Fieber und lokaler Haarausfall auf, während ein Hautausschlag, anders als bei den meisten anderen Rickettsiosen, nur sehr selten zu sehen ist. Die Erkrankung verläuft in der Regel mild und heilt meist ohne Folgeschäden aus. In einigen Fällen kann jedoch der lokale Haarausfall über mehrere Monate bestehen bleiben (Parola et al., 2005).

Rickettsia raoultii wurde im Jahr 2008 als neue Art charakterisiert (Mediannikov et al., 2008). Durch phylogenetische Studien konnten die Autoren zeigen, dass verschiedene Rickettsien-Stämme (Genotypen *Rickettsia* spp. DnS14, RpA4 und DnS28), die bereits früher z.B. in Russland in Zecken nachgewiesen wurden (Rydkina et al., 1999), zur neu definierten Art *R. raoultii* zusammengefasst werden können. Ebenso wie *R. slovaca* galt auch *R. raoultii* lange Zeit als nicht humanpathogen. Parola et al. (2009) konnten jedoch in Frankreich bei einer Untersuchung von 86 Patienten mit TIBOLA in 8% der Fälle *R. raoultii* nachweisen, während die übrigen Erkrankungen durch *R. slovaca* verursacht worden waren. Die Symptome der durch *R. raoultii* und *R. slovaca* verursachten TIBOLA sind identisch.

Rickettsia helvetica wurde erstmals 1979 in der Schweiz in *Ixodes ricinus* identifiziert (Burgdorfer et al., 1979). In Deutschland ist diese Rickettsienart ebenfalls weit verbreitet; beispielsweise wiesen Hartelt et al. (2003) *R. helvetica* in 8,9% der untersuchten *Ixodes ricinus* in Baden-Württemberg nach. Ebenso wie *R. slovaca* und *R. raoultii* galt *R. helvetica* lange Zeit als apathogen, bis die Art 1999 in Schweden als Auslöser einer Perimyokarditis identifiziert wurde (Nilsson et al., 1999b). Weiterhin wurde der Erreger bei mehreren Patienten aus Frankreich und Italien nachgewiesen, die nach einem Zeckenstich Fieber entwickelten (Fournier et al., 2000; Fournier et al., 2004), sowie bei einem Patienten mit Meningitis in Schweden (Nilsson et al., 2010). Die vereinzelt Nachweise menschlicher Erkrankungen gingen mit sehr unterschiedlichen Symptomen einher, sodass es bisher keine Angaben über das typische Bild einer *R. helvetica*-Rickettsiose gibt.

1.6 FSME-VIREN

1.6.1 Historisches

FSME-Viren (FSMEV; engl. tick-borne encephalitis virus = TBEV) sind die Erreger der Frühsommermeningoenzephalitis (FSME). Diese stellt in Europa die wichtigste durch Zecken übertragene Virusinfektion dar.

Erste Beschreibungen einer FSME-ähnlichen Erkrankung stammen aus skandinavischen Kirchenbüchern des 18. Jahrhunderts. 1931 beschrieb der österreichische Arzt Schneider die FSME als Erkrankung, deren Auftreten einem saisonalen Muster folgt. 1937 gelang es dem sowjetischen Wissenschaftler Zilber, das FSME-Virus zu isolieren; er erkannte zudem die Vektorfunktion von *Ixodes persulcatus*. Einige Jahre später, 1939, charakterisierte Pavlovsky die FSME als Zoonose, indem er die Zirkulation des Erregers zwischen Zecken und Säugern beschrieb (Dumpis et al., 1999; Lindquist und Vapalahti, 2008).

Inzwischen wurde das FSME-Virus in fast allen Ländern Europas, in Russland sowie im Fernen Osten nachgewiesen (Dumpis et al., 1999).

1.6.2 Systematik

Das FSME-Virus ist ein Arbovirus (= arthropod borne virus) aus der Gattung *Flavivirus* innerhalb der Familie der *Flaviviridae*. Zu dieser Familie gehören darüber hinaus die Gattungen *Pestivirus* (Schweinepest-Virus) und *Hepacivirus* (Hepatitis C-Virus). Innerhalb der Gattung *Flavivirus* werden zwei Gruppen unterschieden (Abb. 15). Zum Komplex der durch Stechmücken übertragenen Flaviviren gehören beispielsweise das Gelbfieber-, das Dengue- und das West-Nil-Fieber-Virus. Zu den durch Zecken übertragenen Flaviviren gehören neben dem FSME-Virus einige weitere Viren, darunter das Langat-Virus, das Louping-ill-Virus und der Erreger des Omsk hämorrhagischen Fiebers (Dumpis et al., 1999).

Die FSME-Viren werden in drei Subtypen unterteilt, die sich in ihrer geographischen Verbreitung und dem verursachten Krankheitsbild unterscheiden (Ecker et al., 1999); innerhalb jedes Subtyps lassen sich molekularbiologisch zudem verschiedene Stämme differenzieren.

1. Der **fernöstliche Subtyp** wird hauptsächlich durch *Ixodes persulcatus* übertragen.

Bedingt durch das Verbreitungsgebiet des Vektors kommen Viren dieses Typs nur in Russland sowie in Teilen Chinas und Japans vor (Lindquist und Vapalahti,

2008). Die Erkrankung, die als „Russian spring summer encephalitis“ (RSSE) bezeichnet wird, verläuft oft schwer; die Letalität liegt bei 20-40%. Prototyp ist der Stamm Sofjin.

2. Auch für den **sibirischen Subtyp** fungiert *Ixodes persulcatus* als Vektor. Dieser Subtyp ist im Ural, in Sibirien und Russland verbreitet. Schwere Krankheitsverläufe sind hier ebenfalls häufig, die Letalität ist mit 6-8% jedoch deutlich geringer als beim fernöstlichen Typ. Als Prototyp gilt der Stamm Vasilchenko.
3. Der **europäische Subtyp** wird durch *Ixodes ricinus* übertragen und ist in Zentral-, Ost- und Nordeuropa verbreitet (Lindquist und Vapalahti, 2008). Die durch diesen Subtyp hervorgerufene Erkrankung wird als „Central European Encephalitis“ (CEE), Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) oder „tick-borne encephalitis“ (TBE) bezeichnet. Die Erkrankung verläuft deutlich milder als bei Infektionen mit dem fernöstlichen oder dem sibirischen Subtyp; die Letalität beträgt bis zu 2%. Prototyp ist der Stamm Neudoerfl.

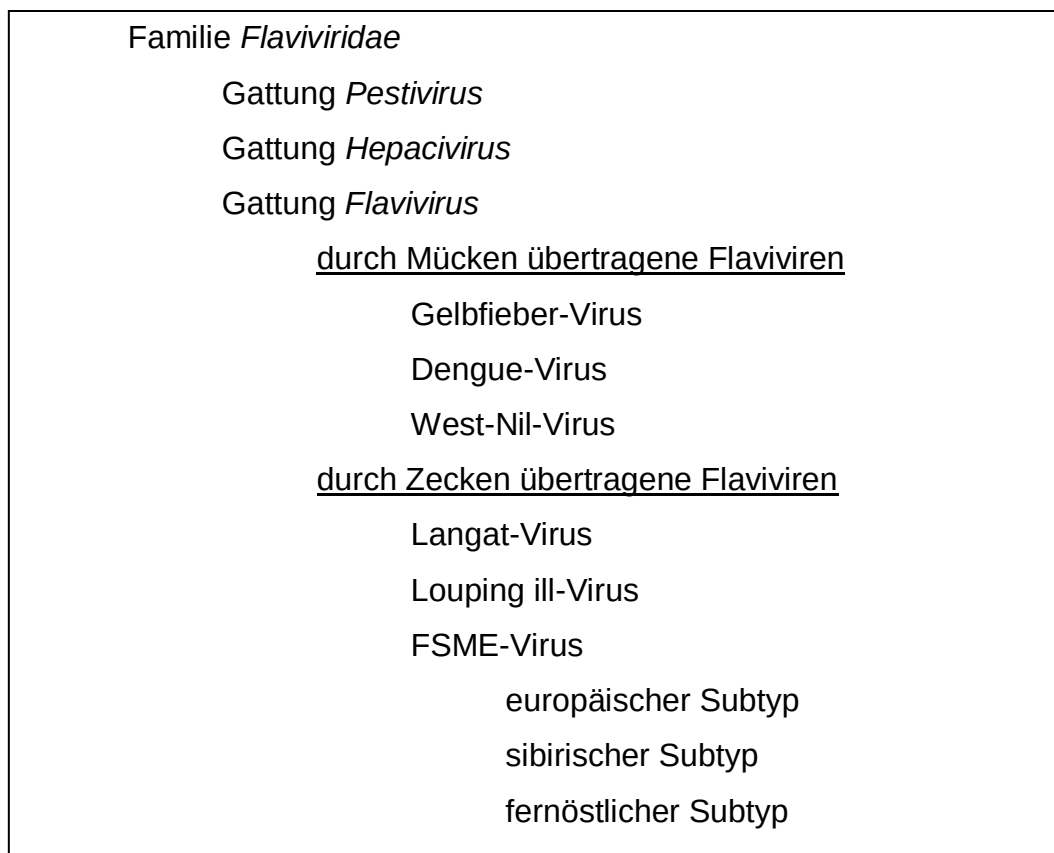


Abb. 15: Systematische Einteilung der FSME-Viren (nach Dumpis et al., 1999; verändert).

1.6.3 Biologie

FSME-Viren sind ikosaedrische, behüllte Viren mit einem Durchmesser von etwa 50nm und einer Genomgröße von ca. 11kb (Lindquist und Vapalahti, 2008).

Das nicht segmentierte Genom ist als Plusstrang-RNA organisiert, die durch eine „cap“-Struktur am 5'-Ende stabilisiert wird. Sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende der RNA befinden sich nicht-kodierende Bereiche. Der offene Leserahmen (open reading frame = ORF) codiert für ein Polyprotein aus 3414 Aminosäuren (Abb. 16), das co- und posttranslational von viralen und wirtszelleigenen Proteasen gespalten wird. Auf diese Weise entstehen drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteine (Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield et al., 2009).

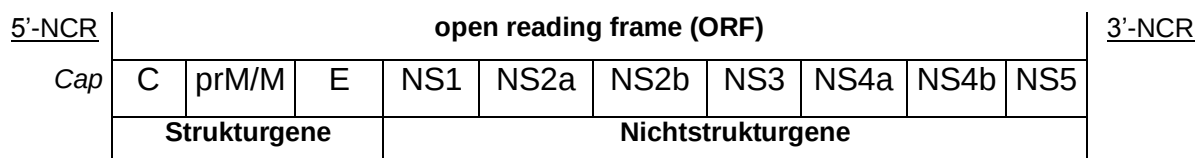


Abb. 16: Organisation des FSME-Virus-Genoms (schematisch). C: Kapsidprotein, prM/M: Glykoprotein, E: envelope-Protein, NS: Nichtstrukturprotein, NCR: nicht-codierende Region, cap: Cap-Struktur der RNA (nach Leyssen et al., 2000; verändert).

Die äußere Form der Viruspartikel wird durch die Strukturproteine C (= Kapsid-Protein), prM/M (= Vorläufer-Membranprotein/Membranprotein) und E (= Envelope-Protein) festgelegt. Das C-Protein bildet gemeinsam mit der viralen RNA das ca. 30nm große, sphärische Nukleokapsid, das von einer Lipid-Doppelschicht umgeben ist. In diese sind die Oberflächenproteine prM und E eingelagert. Das E-Protein dient als Ligand bei der rezeptorvermittelten Endozytose sowie als Fusionsprotein; es ist somit entscheidend am Eindringen des Virus in die Wirtszelle beteiligt. Im unreifen Virus bildet das E-Protein Heterodimere mit dem prM-Protein. Im reifen Virus liegt es hingegen als Homodimer bzw. -trimer vor.

Die sieben Nichtstrukturproteine besitzen vielfältige enzymatische Funktionen; sie dienen unter anderem als Proteasen (NS2a und NS2b), Helicasen (NS3) und RNA-abhängige Polymerasen (NS4a, NS4b, NS5) (Zhang et al., 2003; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield et al., 2009).

Die Aufnahme des FSME-Virus in die Wirtszelle erfolgt über eine rezeptorvermittelte Endozytose (Abb. 17). Dabei bindet das E-Protein, das in diesem Stadium als Homodimer vorliegt, an einen Rezeptor der Wirtszellmembran, was die Endozytose einleitet. Der niedrige pH-Wert innerhalb des Endosoms bewirkt eine Konformationsänderung des E-Proteins, die zur Bildung von Homotrimeren führt. Diese Konformation ermöglicht die Fusion der Virus- mit der Endosomenmembran, da der hierfür benötigte Teil des E-Proteins (= Fusionspeptid) exponiert wird. Durch die Fusion der Membranen gelangt das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle. Hier finden das „uncoating“, d.h. die Freisetzung der RNA aus der Kapsid-Hülle, sowie die Genomreplikation und die Translation statt. Das dabei entstehende Polyprotein wird prozessiert, d.h. durch Proteasen in die funktionsfähigen Einzelproteine gespalten. Das Virus-Assembly, d.h. der Zusammenbau der einzelnen Bestandteile des Virus, findet im Endoplasmatischen Retikulum statt. In den noch unreifen Viruspartikeln liegt das Membranprotein M als Vorläufer-Protein prM vor, das Heterodimere mit dem E-Protein ausbildet, sodass vorzeitige pH-induzierte Konformationsänderungen des E-Proteins verhindert werden. Die Viren werden über den sekretorischen Weg der Wirtszelle transportiert. Der niedrige pH-Wert in den Transportvesikeln des Golgi-Apparats löst die Spaltung von prM zum M-Protein durch die wirtszelleigene Protease Furin aus; die E-Proteine bilden daraufhin Homodimere aus. Die reifen, infektiösen Viren werden durch Fusion der Transportvesikel- mit der Wirtszellmembran aus der Wirtszelle entlassen (Stiasny und Heinz, 2006; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield et al., 2009).

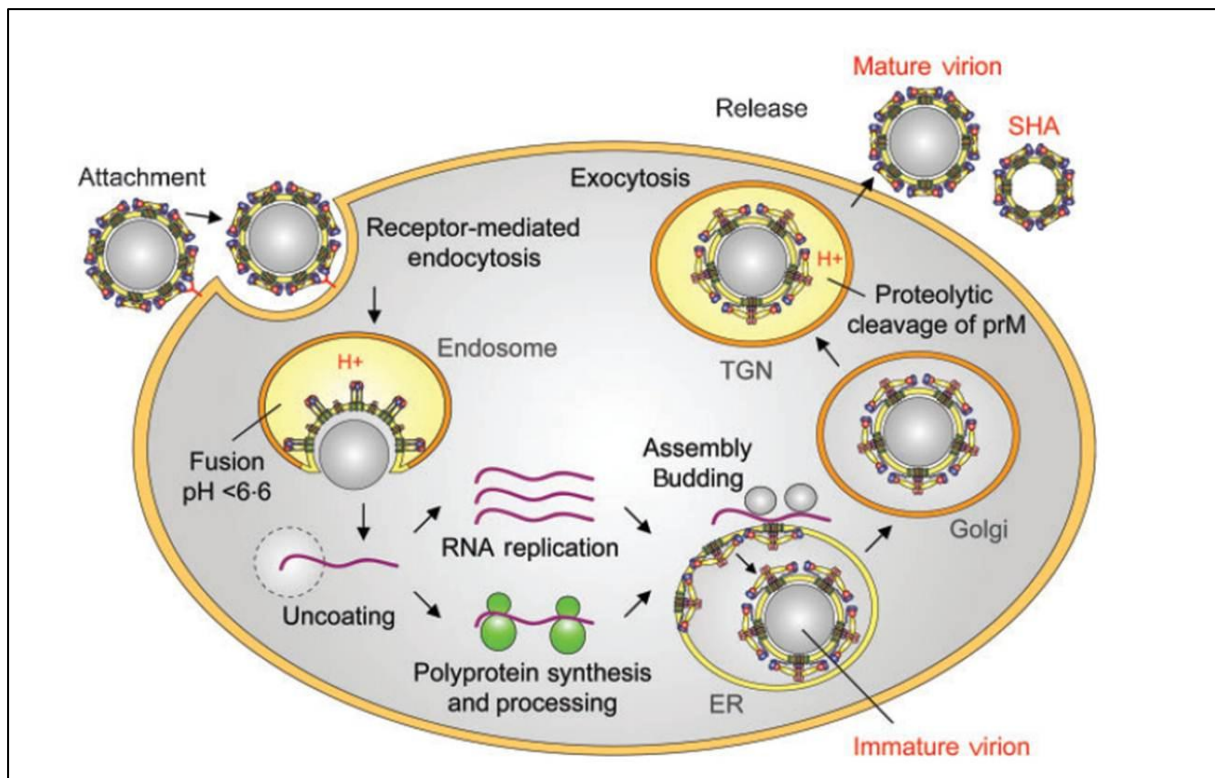


Abb. 17: Schematische Darstellung des Lebenszyklus der Flaviviren. ER = Endoplasmatisches Retikulum, TGN = trans-Golgi-Netzwerk (Stiasny und Heinz, 2006).

1.6.4 FSME

Die FSME-Viren werden in erster Linie durch Zeckenstiche übertragen. Da sich die Viren in den Speicheldrüsen der Zecken vermehren, erfolgt die Übertragung innerhalb der ersten Minuten nach dem Stich (Mansfield et al., 2009). Infektionen durch den Verzehr von unpasteurisierter Milch infizierter Tiere (v.a. Ziegen) sind ebenfalls möglich, kommen in Westeuropa jedoch nur selten vor; in Osteuropa ist diese Infektionsquelle hingegen von größerer Bedeutung (Dumpis et al., 1999).

Man geht davon aus, dass ein großer Teil der FSME-Virus-Infektionen symptomlos verläuft und somit unbemerkt bleibt (Dumpis et al., 1999). Symptomatische Erkrankungen sind meist durch einen biphasischen Krankheitsverlauf gekennzeichnet.

Die Inkubationszeit nach einem Zeckenstich beträgt etwa 7-14 Tage. Die FSME-Viren vermehren sich zunächst lokal im Bereich der Einstichstelle und der regionären Lymphknoten. Über Lymph- und Blutgefäße findet anschließend eine Ausbreitung in das retikuloendotheliale System statt. Die daraus resultierende Virämie wird von

einer akuten fiebrigen Erkrankung begleitet, die das erste Krankheitsstadium darstellt. Nach einer symptomlosen Phase kann ein zweites Stadium folgen, bei dem die Ausbreitung der stark neurotrophen Viren ins ZNS und die dortige Virusvermehrung zu Entzündungen und Zerstörungen von Nervenzellen führen (Mansfield et al., 2009).

In der ersten Krankheitsphase, die etwa 2-7 Tage andauert, manifestiert sich die FSME als unspezifische Erkrankung mit grippeartigen Symptomen. Hierzu gehören Fieber, allgemeines Krankheitsgefühl, Kopf- und Gliederschmerzen sowie Nackenschmerzen. Bei 80-90% der Patienten heilt die Erkrankung nach dieser ersten Phase folgenlos aus. Etwa 10% der Erkrankten entwickeln nach einer 2-10 Tage dauernden asymptomatischen Phase eine akute ZNS-Symptomatik, die mit hohem Fieber einhergeht und sich als Meningitis (etwa 47% der Patienten mit ZNS-Manifestation), Meningoenzephalitis (43%) oder Meningoenzephalomyelitis (10%) äußert (Kaiser et al., 1999). Symptome einer Meningitis (Entzündung der Hirnhäute) sind starke Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Übelkeit und Schwindel. Diese Verlaufsform heilt in den meisten Fällen ohne Folgeschäden aus. Bei der Meningoenzephalitis (Entzündung der Hirnhäute und des Gehirns) treten zusätzlich Bewusstseins- und Koordinationsstörungen auf. Die Meningoenzephalomyelitis (Entzündung der Hirnhäute, des Gehirns und des Rückenmarks) stellt die schwerste Verlaufsform einer FSME dar. Hierbei können neben den oben genannten Symptomen zusätzlich schlaffe Lähmungen der Extremitäten (Hemi- oder Tetraparesen), Schluck- und Sprechstörungen, Lähmungen der Gesichtsmuskulatur oder Atemlähmungen auftreten.

Bei etwa 10-20% der Patienten mit ZNS-Manifestation treten Folgeschäden, z.B. in Form von anhaltenden Lähmungen, auf. Die Letalität liegt bei Infektionen mit dem europäischen FSME-Virus-Subtyp bei etwa 1-2%.

Die Schwere der Erkrankung nimmt generell mit zunehmendem Alter der Patienten deutlich zu. So treten bei Kindern meist nur mild verlaufende Meningitiden auf, die in den allermeisten Fällen folgenlos ausheilen, während schwere Verläufe mit Komplikationen vor allem bei älteren Patienten vorkommen (Dumpis et al., 1999; Kaiser, 1999; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield et al., 2009).

Zur Diagnose der FSME werden v.a. serologische Untersuchungsmethoden angewendet. Dabei ist zu beachten, dass Antikörper gegen FSME-Viren starke Kreuzreaktionen innerhalb der Flaviviren zeigen; dies kann die Diagnose erschweren, beispielsweise bei Patienten mit Gelbfieber-Impfung (Mansfield et al., 2009).

Bis heute existieren keine antiviralen Medikamente zur Behandlung der FSME; die Therapie beschränkt sich daher auf symptomatische Maßnahmen. Aus diesem Grund ist die Prophylaxe von großer Bedeutung. Es stehen Impfstoffe zur aktiven Immunisierung zur Verfügung, die meist aus inaktivierten FSME-Viren bestehen und zur Bildung neutralisierender Antikörper führen. Für einen ausreichenden Impfschutz wird eine Dreifach-Impfung durchgeführt; alle 3-5 Jahre sind Auffrischungen nötig (Dumpis et al., 1999; Mansfield et al., 2009). Daneben spielt die Expositionsprophylaxe, d.h. das Vermeiden von Zeckenstichen, eine entscheidende Rolle.

1.6.5 Epidemiologie und Verbreitung

Das FSME-Virus zirkuliert in Naturherden zwischen Zecken und kleinen Säugetieren wie z.B. Nagern. Diese Naturherde existieren jedoch nicht flächendeckend im Verbreitungsgebiet der Zecken, sondern zeigen eine sehr kleinräumige, inselartige Verteilung (Kimmig et al., 2001a; Mansfield et al., 2009). Die Prävalenz von FSME-Viren in Zecken in einem endemischen Gebiet liegt in der Regel zwischen 0,5% und 5% (Dumpis et al., 1999).

Infizierte Säugetiere weisen nur eine sehr kurze virämische Phase auf, d.h. die FSME-Viren zirkulieren nur für kurze Zeit im Blut der Tiere. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Zecke beim Saugakt an einem virämischen Wirt mit FSME-Viren infiziert, ist daher nur gering. Aus diesem Grund spielt das „Co-feeding“ bei der Infektion von Zecken eine entscheidende Rolle. Saugt eine infizierte Nymphe in unmittelbarer Nähe zu einer nichtinfizierten Larve am selben Wirt Blut, so gelangen die FSME-Viren über virustragende Wirtszellen zur Einstichstelle der Larve, die sich auf diese Weise infiziert. Durch das Co-feeding ist somit eine Infektion von Zecken ohne eine Virämie des Wirts möglich. Voraussetzung für diese Art der Virus-Weitergabe ist die zeitgleiche Aktivität verschiedener Zeckenstadien in einem Gebiet (Randolph et al., 1996; Labuda et al., 1996).

Die FSME-Viren werden zudem transstadial von einem Zeckenstadium an das nächste weitergegeben. Eine transovariable Übertragung findet hingegen nur in geringem Maße statt und ist daher von untergeordneter Bedeutung (Lindquist und Vapalahti, 2008).

Das Verbreitungsgebiet der FSME-Viren wird durch das Vorkommen der Hauptüberträger, *I. ricinus* für den europäischen Subtyp bzw. *I. persulcatus* für den sibirischen und den fernöstlichen Subtyp, bestimmt (Lindquist und Vapalahti, 2008; Abb. 18). FSME-Viren sind somit in Mittel- und Osteuropa, in Russland und im fernen Osten (China, Japan) endemisch (Dumpis et al., 1999). Im Jahr 2008 bestand in 16 betroffenen Ländern Meldepflicht (Süss, 2008).

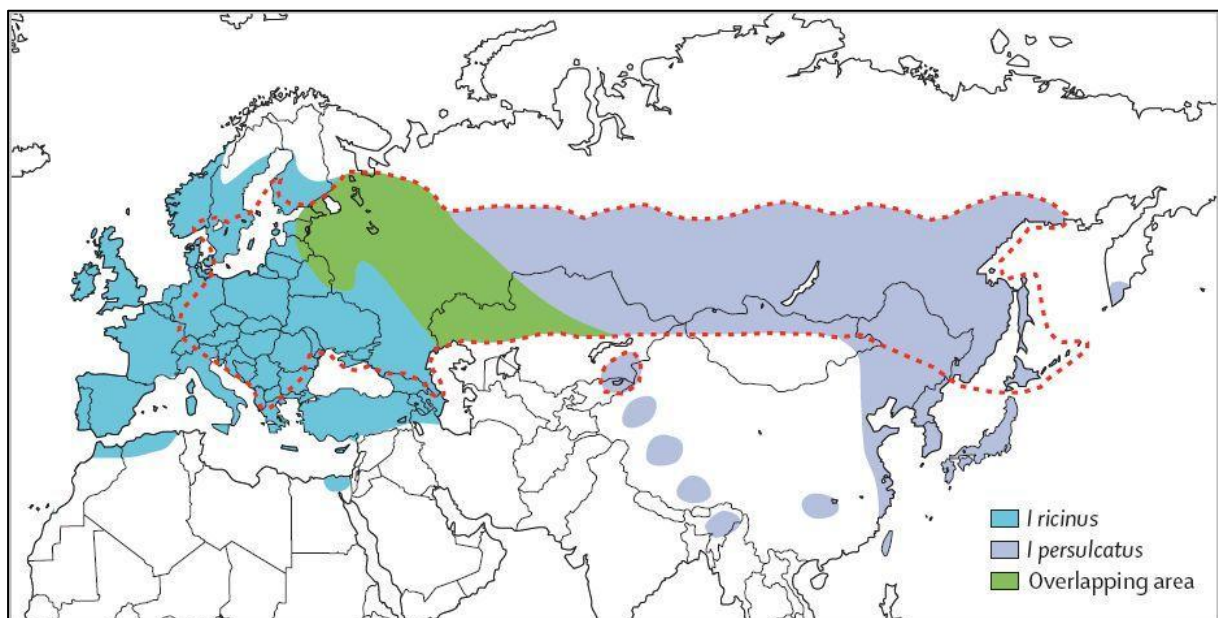


Abb. 18: Verbreitung der FSME-Viren (eingegrenzt durch die rot gestrichelte Linie) sowie der Vektoren *I. ricinus* (blau) und *I. persulcatus* (lila). In den grün gefärbten Bereichen sind beide Arten verbreitet (Lindquist und Vapalahti, 2008).

In Deutschland ist die FSME seit 2001 nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Anhand der Meldedaten werden durch das Robert-Koch-Institut Risikogebiete, d.h. Gebiete mit endemischem Vorkommen der FSME, definiert. Diese finden sich vor allem im Süden des Landes. Die am stärksten betroffenen Bundesländer sind Baden-Württemberg und Bayern, daneben Hessen, Thüringen und Rheinland-Pfalz. In den übrigen Bundesländern traten bisher nur vereinzelte Fälle auf. Seit 2001 wurden in ganz Deutschland insgesamt 3126 FSME-Fälle

registriert. Durchschnittlich werden jedes Jahr etwa 300 Erkrankungen im gesamten Bundesgebiet bzw. 140 in Baden-Württemberg gemeldet (Robert Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 18.1.2011). Ungewöhnlich viele Erkrankungen traten hingegen in den Jahren 2005 und 2006 (deutschlandweit 546 Fälle) auf. In Abb. 19 ist die Zahl der jährlichen FSME-Erkrankungen in Deutschland sowie den am stärksten betroffenen Bundesländern dargestellt.

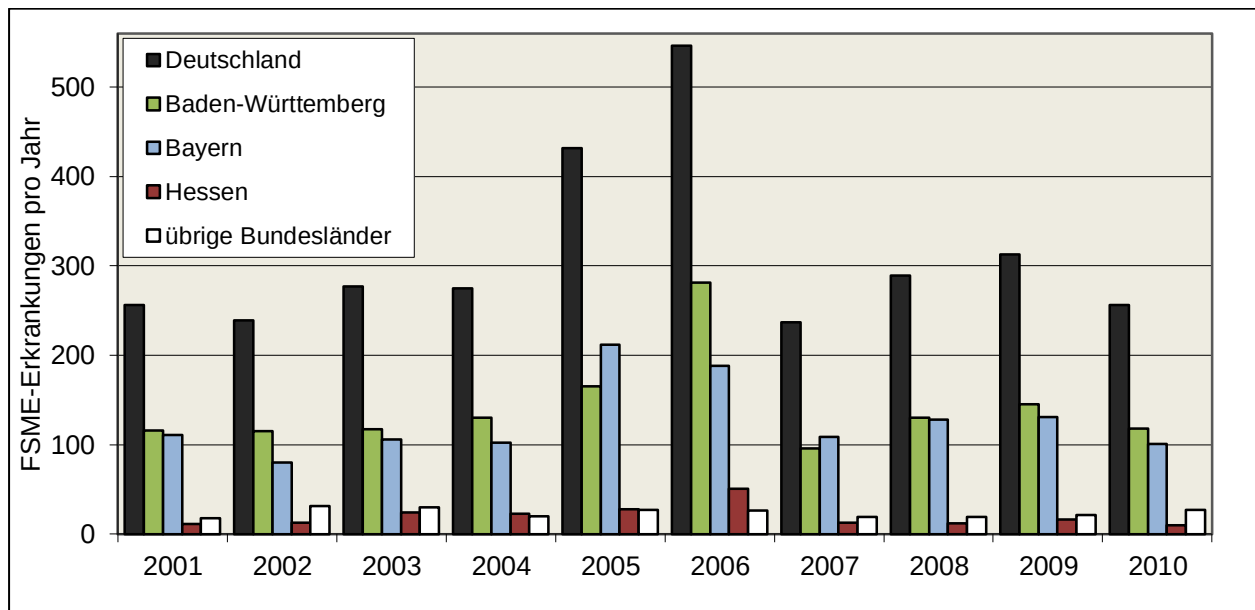


Abb. 19: FSME-Fälle in Deutschland und einzelnen Bundesländern, 2001-2010 (Quelle: Robert Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 18.1.2011).

Seit den 1980er Jahren ist die Zahl der FSME-Virus-Infektionen in nahezu allen Endemiegebieten innerhalb Europas und Russlands deutlich angestiegen (Süss, 2008). Hierfür werden unter anderem Veränderungen der Naturherde aufgrund der fortschreitenden Klimaveränderungen verantwortlich gemacht (Lindgren et al., 2000; Süss, 2008; Rizzoli et al., 2009).

1.7 HANTAVIREN

1.7.1 Historisches

Hantavirus-Infektionen stellen in Deutschland die wichtigste durch Nager übertragene Zoonose dar. Zudem gelten sie in Europa als wesentlichste Ursache für infektionsbedingtes Nierenversagen (Faulde et al., 2000).

Nierenerkrankungen, die aus heutiger Sicht auf Hantavirus-Infektionen zurückzuführen sein dürften, tauchen bereits in chinesischen Schriften aus dem 12. Jahrhundert auf. Größere Aufmerksamkeit erlangten sie jedoch erst in den 1950er Jahren, als während des Koreakriegs über 3000 Soldaten der vereinten Nationen an hohem Fieber, Hämorrhagien und Nierenversagen erkrankten. US-Militärärzte bezeichneten die Krankheit als „Koreanisches Hämorrhagisches Fieber“; sie vermuteten eine virale Infektion als Krankheitsursache (Lednicky, 2003). 1976 zeigte der Koreaner Ho Wang Lee, dass Antigene aus dem Lungengewebe von Brandmäusen (*Apodemus agrarius*) aus Korea mit Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit Koreanischem Hämorrhagischem Fieber reagierten. Einige Jahre später gelang es ihm, den Erreger aus dem Lungengewebe von Brandmäusen zu isolieren, die in der Nähe des Flusses Hantaan zwischen Nord- und Südkorea gefangen wurden (Lee et al., 1978). Aufgrund des Fundorts wurde das Virus später als „Hantaan-Virus“ bezeichnet, die zugehörige Gattung erhielt den Namen Hantavirus. Im Nachhinein wurden ähnliche Erkrankungen, die im Laufe des 20. Jahrhunderts in Asien und Europa beschrieben wurden (z.B. Nephropathia epidemica in Schweden) ebenfalls als Hantavirus-Infektionen identifiziert und schließlich unter dem Begriff „Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom“ (= HFRS) zusammengefasst (Vapalahti et al., 2003).

1993 traten im Süden der USA mehrere Todesfälle nach Pneumonien auf, die durch ein sich rasch entwickelndes interstitielles Lungenödem mit Ateminsuffizienz gekennzeichnet waren. In der Folge gelang die Isolierung und Charakterisierung eines neuen Hantavirustyps sowohl aus Patientenseren als auch aus Nagern (Schmaljohn und Hjelle, 1997). Die Erkrankung, die später sowohl in Nord- als auch in Mittel- und Südamerika auftrat, wurde zunächst als „Hantavirus pulmonales Syndrom“ bezeichnet; inzwischen ist die Bezeichnung „Hantavirus kardiopulmonales Syndrom“ (= HCPS) gebräuchlich, da das Herz durch die Infektion ebenfalls häufig geschädigt wird (Klempa, 2009).

1.7.2 Systematik und Biologie

Die Hantaviren gehören zur Gattung *Hantavirus* innerhalb der Familie *Bunyaviridae*. Weitere Vertreter dieser Familie sind u.a. das Krim-Kongo-Fieber-Virus (Gattung *Nairovirus*) und das Sandmückenfieber-Virus (Gattung *Phlebovirus*) (Krüger, 2009). Hantaviren werden ausschließlich durch Nager übertragen, weshalb sie auch als Roboviren (= **rodent-borne** viruses) bezeichnet werden. Im Gegensatz dazu nutzen alle anderen Bunyaviren Arthropoden als Vektoren (Krüger, 2009; Lednicky, 2003). Innerhalb der Gattung *Hantavirus* werden anhand genetischer und serologischer Merkmale verschiedene Virustypen differenziert, die sich zudem in ihrer Verbreitung und den durch sie ausgelösten Krankheitsbildern unterscheiden (siehe 1.7.4). Jeder Virustyp nutzt eine bestimmte Nagerart als Reservoir, wobei die phylogenetischen Beziehungen der Hantaviren die verwandtschaftlichen Verhältnisse der Nager widerspiegeln. Darüber hinaus ist die Anpassung jedes Virustyps an seinen jeweiligen Reservoirnager sehr ausgeprägt, sodass Infektionen anderer Nagerarten mit diesem Virustyp (sogenannte „spillover“-Infektionen) nur sehr selten vorkommen (Krüger, 2009; Lednicky, 2003). Diese Eigenschaften lassen eine enge Koevolution der Hantaviren und ihrer Reservoirnager vermuten (Vapalahti et al., 2003; Krüger, 2009).

Hantaviren sind behüllte RNA-Viren, die eine kugel- oder eiförmige Morphologie mit einem Durchmesser von 80-120nm aufweisen (Lednicky, 2003; Vapalahti et al., 2003). Das etwa 12kb umfassende, segmentierte Genom ist als Negativ-Strang-RNA organisiert. Das L-Segment (= large) codiert für die virale RNA-Polymerase, die auch als L-Protein bezeichnet wird (Abb. 20). Die beiden Hüllproteine G1 und G2 werden vom M-Segment (= medium) codiert, das Nukleokapsid vom S-Segment (= small) (Lednicky, 2003).

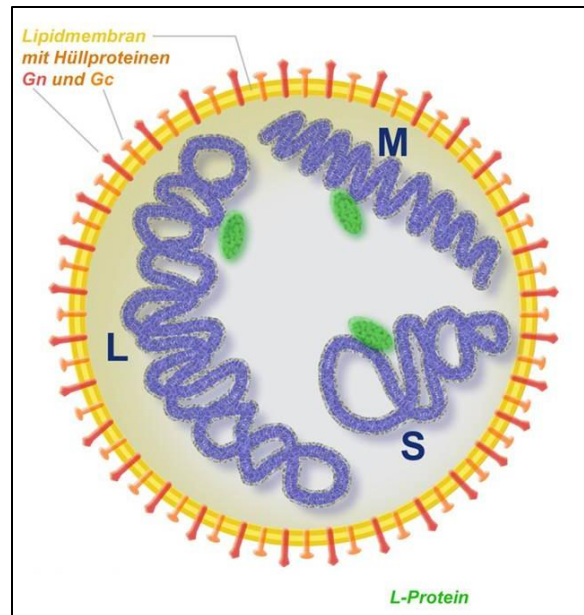


Abb. 20: Schematischer Aufbau eines Hantavirus mit den drei Genomsegmenten S (small), M (medium) und L (large) (Quelle: de.wikipedia.org).

Hantaviren vermehren sich vor allem im Zytoplasma von Kapillar-Endothelzellen. Die erhöhte Permeabilität der Kapillaren, die die Hauptursache für die Symptomatik der Hantavirenose darstellt, wird jedoch nicht auf zytopathische Effekte der Viren zurückgeführt. Vielmehr sind hierfür offenbar immunpathologische Vorgänge verantwortlich, die durch zytotoxische T-Zellen oder proinflammatorische Zytokine verursacht werden. Bis heute ist jedoch die exakte Pathogenese der Hantavirenose nicht vollständig geklärt (Kanerva et al., 1998; Lednicky, 2003; Vapalahti et al., 2003).

1.7.3 Erkrankung

Hantaviren können, je nach Virustyp, zwei unterschiedliche Erkrankungen hervorrufen (siehe Tab. 5). Beim hämorrhagischen Fieber mit renalem Syndrom (= HFRS) steht die Nierenbeteiligung im Vordergrund, während das Hantavirus kardiopulmonale Syndrom (= HCPS) vor allem Lunge und Herz betrifft. Für keine der beiden Erkrankungen existiert eine spezifische Therapie, es ist lediglich eine Behandlung der Symptome möglich. Eine Impfung ist bisher nicht verfügbar (Lednicky, 2003; Krüger, 2009).

Humane Infektionen erfolgen zum überwiegenden Teil über die Atemluft, d.h. durch Inhalation von virushaltigen Aerosolen, die durch infizierte Nager ausgeschieden

werden. Infektionen durch Bisse erkrankter Nager kommen hingegen selten vor (Faulde et al., 2000).

Das **HFRS** wird vor allem durch die Virustypen Dobrava, Hantaan und Seoul hervorgerufen und ist in Asien und Europa verbreitet; in Amerika kommt es hingegen nicht vor. Die Schwere der Erkrankung hängt unter anderem vom beteiligten Virustyp ab: Dobrava- und Hantaan-Infektionen verlaufen meist schwer, Seoul-Infektionen mittelschwer (Schmaljohn und Hjelle, 1997).

Die Erkrankung verläuft charakteristischerweise in fünf Phasen. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Wochen entwickelt sich zunächst eine *Fieberphase* mit plötzlichem Einsetzen von unspezifischen grippeartigen Symptomen. Die zweite Phase, die nach ca. 3-5 Tagen eintritt, ist durch *Hypotonie* gekennzeichnet, die sehr schwer sein kann. Weiterhin treten Thrombozytopenie, Übelkeit und Erbrechen sowie Hämorrhagien auf. Todesfälle in diesem Stadium sind vor allem auf die Entwicklung eines Schockzustands zurückzuführen. Eine Nierenbeteiligung führt in der nächsten Krankheitsphase zur *Oligurie* durch akutes Nierenversagen; in dieser Phase treten die meisten Todesfälle auf. An die Oligurie schließt sich eine ausgeprägte diuretische Phase an, die durch eine häufig mehrmonatige *Polyurie* gekennzeichnet ist. Die abschließende *Genesungsphase* kann ebenfalls über mehrere Wochen bis Monate bestehen (Schmaljohn und Hjelle, 1997; Faulde et al., 2000; Vapalahti et al., 2003; Lednicky, 2003; Krüger, 2009).

Extrarenale Manifestationen kommen ebenfalls vor, sind jedoch verhältnismäßig selten. Sie äußern sich vor allem durch Hepatitis, Myokarditis oder ZNS-Beteiligung (Krüger, 2009).

Der in Europa verbreitete Virustyp Puumala löst eine milde Form des HFRS, die sogenannte **Nephropathia epidemica** (= NE), aus. Bei dieser Erkrankung sind die Symptome deutlich milder als bei der HFRS, es treten keine Hämorrhagien auf, und die einzelnen Phasen der Erkrankung sind weniger stark ausgeprägt. Asymptomatische bzw. subklinische Infektionen sind bei dieser Form sehr häufig (Kimmig et al., 2001b; Lednicky, 2003; Vapalahti et al., 2003). Der in Europa weit verbreitete Virustyp Tula kann ebenfalls eine milde Form des HFRS auslösen. Bisher wurden jedoch nur vereinzelte humane Tula-Infektionen beschrieben, die Humanpathogenität dieses Serotyps wird daher als gering angesehen (Klempa et al., 2003; Schmidt-Chanasit et al., 2010).

Die Letalität des HFRS bzw. der NE ist abhängig vom beteiligten Virustyp. Während sie bei Dobrava- und Hantaan-Infektionen 5-10% sowie bei Infektionen mit dem Typ Seoul 2% beträgt, weisen Puumala-Infektionen lediglich eine sehr geringe Letalität von unter 0,1% auf.

Das **HCPS** wird meist durch die Virustypen Sin Nombre und Andes hervorgerufen und ist in Nord-, Mittel- und Südamerika verbreitet. Die Erkrankung verläuft in der Regel sehr schwer mit einer Letalität von bis zu 40%.

Nach einer Inkubationszeit von ca. 14-17 Tagen beginnt die Erkrankung mit einer ausgeprägten Fieberphase mit grippeartigen Symptomen. Lungen- und Herzmanifestation äußern sich durch trockenen Husten, Tachypnoe, Tachykardie und Hypotonie. In den meisten Fällen entwickelt sich ein schweres Lungenödem, das zum Tod führen kann. Weitere Todesursachen sind Schock und Herzversagen (Lednicky, 2003; Schmaljohn und Hjelle, 1997).

Extrathorakale Manifestationen, wie z.B. Niereninsuffizienz, kommen beim Virustyp Sin Nombre kaum vor, wurden aber bei anderen amerikanischen Hantaviren (Andes, Black Creek Canal) beobachtet (Schmaljohn und Hjelle, 1997).

Zur Diagnose von Hantavirus-Erkrankungen kommen vor allem serologische Verfahren wie ELISA oder IFT zum Einsatz. IgM-Antikörper sind meist bereits beim Auftreten der ersten Symptome nachweisbar, während IgG-Antikörper etwas später auftreten. Bei der serologischen Diagnostik muss berücksichtigt werden, dass Antikörper gegen bestimmte Virustypen Kreuzreaktionen untereinander aufweisen. So besteht eine starke Kreuzreaktivität zwischen Vertretern der Puumala-Gruppe (Puumala, Tula und Sin Nombre) sowie zwischen Viren der Hantaan-Gruppe (Hantaan, Dobrava und Seoul), wohingegen die Kreuzreaktionen zwischen Vertretern verschiedener Gruppen, wie z.B. Puumala und Dobrava, nur gering ausfallen. Die sichere serologische Unterscheidung der Hantavirustypen erfordert daher den Einsatz mehrerer Testmethoden mit unterschiedlichen Antigenen (Kimmig et al., 2001b; Vapalahti et al., 2003).

Der molekularbiologische Nachweis der Erreger im Blut gelingt nur in den ersten Tagen der Erkrankung, da nur eine sehr kurze virämische Phase auftritt (Krüger, 2009).

1.7.4 Epidemiologie und Verbreitung

Nagetiere, die die Reservoirwirte der Hantaviren darstellen, entwickeln asymptomatisch verlaufende, persistierende Infektionen (Easterbrook und Klein, 2008). Infizierte Tiere scheiden die Erreger über Kot, Urin und Speichel aus und kontaminieren auf diese Weise ihre Umgebung; die Viren können in der Umwelt bis zu zwei Wochen überleben (Vapalahti et al., 2003). Sowohl Nager als auch Menschen infizieren sich überwiegend durch Inhalation von virushaltigen Aerosolen bzw. erregerhaltigem Staub. Eine Übertragung der Viren von Mensch zu Mensch wurde lediglich für das in Südamerika verbreitete Andes-Virus nachgewiesen (Padula et al., 1998; Lednicky, 2003).

Die Verbreitung der Hantaviren wird im Wesentlichen durch die Verbreitung der jeweiligen Reservoirwirte bestimmt; einen Überblick über einige Subtypen, deren Verbreitung und Reservoirwirte gibt Tab. 5.

Tab. 5: Übersicht über einige Hantavirustypen, deren Reservoirwirte und Verbreitung. HFRS = Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom; NE = Nephropathia epidemica; HCPS = Hantavirus kardiopulmonales Syndrom (nach Lednicky, 2003 und Krüger, 2009; verändert).

Virustyp	Erkrankung	Reservoirwirt		Verbreitung
Dobrava (mitteleuropäisch)	HFRS	<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)	Murinae	Mittel- und Osteuropa
Dobrava (südosteuropäisch)	HFRS	<i>Apodemus flavicollis</i> (Gelbhalsmaus)		Balkan
Hantaan	HFRS	<i>Apodemus agrarius</i> (Brandmaus)		China, Korea, Russland
Seoul	HFRS	<i>Rattus norvegicus</i> (Wanderratte) <i>Rattus rattus</i> (Hausratte)		weltweit
Prospect Hill	unbekannt	<i>Microtus pennsylvanus</i> (Wiesenwühlmaus)	Arvicolinae	Nordamerika
Puumala	NE	<i>Myodes glareolus</i> (Rötelmaus)		Europa
Tula	unbekannt	<i>Microtus arvalis</i> (Feldmaus)		Europa
Andes	HCPS	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i> (Reisratte)	Sigmodontinae	Argentinien, Chile
Black Creek Canal	HCPS	<i>Sigmodon hispidus</i> (Baumwollratte)		USA (v.a. Florida)
Sin Nombre	HCPS	<i>Peromyscus maniculatus</i> (Hirschmaus)	Neotominae	USA, Kanada, Mexiko

Weltweit erkranken jährlich über 200 000 Menschen an Hantavirus-Infektionen. Die meisten Fälle treten in Asien, besonders in China und Korea, auf (Faulde et al., 2000). In Europa sind die Balkanländer und Skandinavien besonders stark betroffen (Vapalahti et al., 2003).

In Deutschland sind mit Dobrava und Puumala zwei Hantavirustypen vertreten. Dobrava-Infektionen treten, aufgrund der begrenzten Verbreitung der Brandmaus, lediglich in Nord- und Ostdeutschland auf, während Puumala-Infektionen im gesamten Bundesgebiet vorkommen (Krüger, 2009). Daneben ist in Deutschland auch der Virustyp Tula verbreitet, dessen humanmedizinische Bedeutung jedoch noch unklar ist; bisher wurde lediglich über einen einzigen Fall einer Tula-Infektion in Deutschland berichtet (Klempa et al., 2003).

Hantavirus-Infektionen sind in Deutschland nach dem Infektionsschutzgesetz meldepflichtig. Es treten zum überwiegenden Teil Puumala-Infektionen auf, Infektionen mit anderen Virustypen wie z.B. Dobrava werden nur vereinzelt gemeldet (Piechotowski et al., 2008). Aufgrund der unspezifischen Symptomatik und des häufig sehr milden Krankheitsverlaufs besonders von Puumala-Infektionen dürfte die Zahl der tatsächlichen Infektionen die der gemeldeten Fälle deutlich übersteigen (Krüger, 2009). Etwa 50% aller Puumala-Infektionen treten in Baden-Württemberg auf, wobei die Schwäbische Alb, insbesondere der Landkreis Reutlingen, am stärksten betroffen ist. Daneben werden auch in Bayern, Hessen, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen häufig hohe Fallzahlen registriert (Piechotowski et al., 2008).

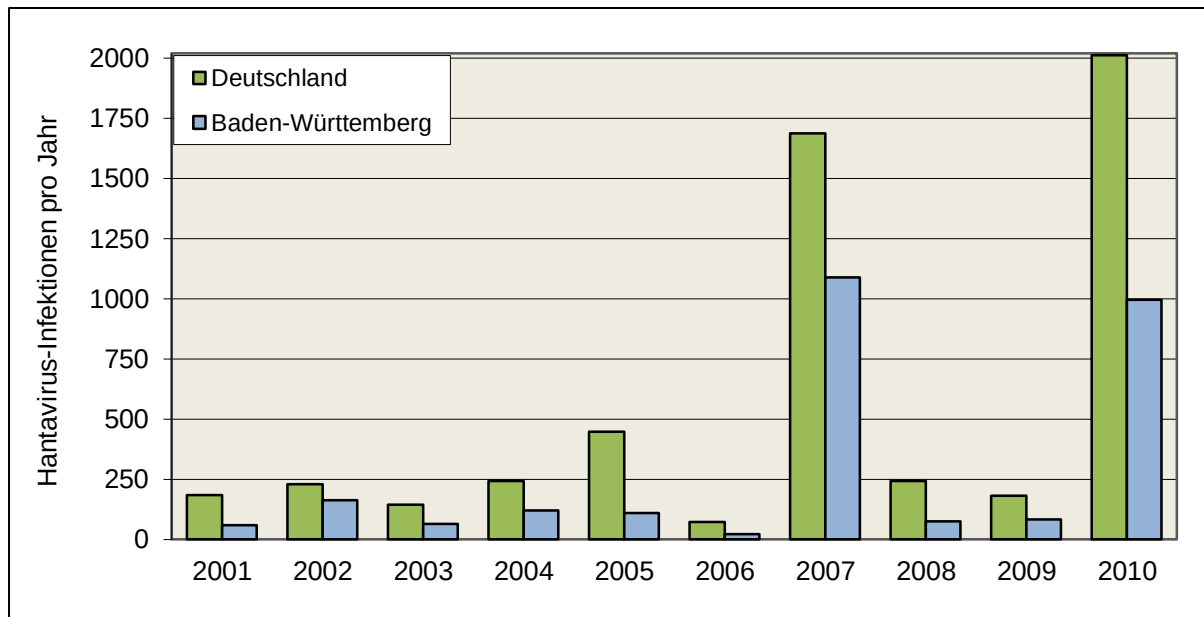


Abb. 21: Hantavirus-Infektionen in Deutschland (grün) und Baden-Württemberg (blau), 2001-2010
(Quelle: Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 4.2.2011).

In den Jahren 2001-2010 wurden deutschlandweit 5441 Puumala-Infektionen gemeldet; die Zahl der Erkrankungen liegt meist zwischen 150 und 400 pro Jahr (Abb. 21; Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 4.2.2011). Im Jahr 2007 wurde hingegen die ungewöhnlich hohe Zahl von 1688 Hantavirusinfektionen gemeldet (Hofmann et al., 2008), während im darauffolgenden Jahr mit 243 Erkrankungen wiederum ein durchschnittlicher Wert ermittelt wurde. Im Jahr 2010 wurden mit 2122 Erkrankungen so viele Hantavirusinfektionen gemeldet wie nie zuvor (Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 4.2.2011). Ähnliche Schwankungen der jährlichen Hantavirus-Erkrankungen werden auch in anderen Ländern beobachtet; die Gründe hierfür sind bisher nicht ausreichend geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass Schwankungen der Individuenzahl innerhalb der Röteldauspopulationen eine entscheidende Rolle spielen. Eine hohe Populationsdichte begünstigt die Ausbreitung der Viren innerhalb einer Population. Die daraus resultierende große Zahl an infizierten Tieren führt wiederum zu einer starken Kontamination der Umwelt und somit zu einem hohen Infektionsrisiko für den Menschen. Die Gründe für Populationsschwankungen der Röteldäuse sind vielfältig und beruhen, je nach Gebiet, auf regelmäßigen Populationszyklen, günstigen klimatischen Bedingungen oder Veränderungen im Nahrungsangebot (z.B. Buchenmast) (Burkhardt und Schlund, 2005; Olsson et al., 2010).

Da keine Impfung gegen Hantavirus-Infektionen existiert, kommt der Expositionsprophylaxe große Bedeutung zu. Das Infektionsrisiko ist bei bestimmten Tätigkeiten, wie z.B. bei der Getreideernte, beim Holzhacken oder beim Reinigen von Hütten, die mit Nagerfäkalien kontaminiert sind, besonders hoch, insbesondere, wenn dabei infektiöser Staub aufgewirbelt wird. Zum Schutz vor Infektionen wird daher die Bekämpfung von Nagern innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe von Häusern empfohlen sowie die Vermeidung von Staubaufwirbelungen bei der Reinigung von potentiell kontaminierten Räumen, beispielsweise durch vorheriges Befeuchten. Auch das Tragen einer Atemschutzmaske kann bei bestimmten Tätigkeiten sinnvoll sein (Lednicky, 2003; Vapalahti et al., 2003; Krüger, 2009; Faber et al., 2010).

1.8 ZIELE DER ARBEIT

Um die Gefährdung der Bevölkerung durch zeckenübertragene und nagerassoziierte Krankheitserreger einschätzen zu können, sind detaillierte Kenntnisse über deren Epidemiologie nötig. Ziel dieser Arbeit war es daher, die aktuelle Verbreitung bakterieller (*Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp.) und viraler Erreger (FSME-Viren, Hantaviren) in Naturherden in Süddeutschland zu ermitteln.

Das durch *Coxiella burnetii* verursachte Q-Fieber ist eine Zoonose, die vor allem über Schafe auf den Menschen übertragen wird. Daneben gibt es Vermutungen, dass die Erreger in Naturherden zwischen Nagern und Zecken zirkulieren; bis heute ist unklar, welche Bedeutung solche Herde in der Epidemiologie des Q-Fiebers in Deutschland haben. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Zecken der Gattung *Dermacentor* sowie Nager aus Q-Fieber-Endemiegebieten untersucht.

Dermacentor marginatus und *D. reticulatus* fungieren als Vektoren humanpathogener Rickettsien; bisher ist jedoch nur wenig darüber bekannt, welche Rickettsienarten in Süddeutschland verbreitet sind. Daher bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die aktuelle Prävalenz von *Rickettsia* spp. in diesen Zecken zu ermitteln sowie die Arten der detektierten Rickettsien zu bestimmen. Daneben sollte durch die Untersuchung von Nagern deren Rolle als Reservoirwirte der Rickettsien überprüft werden.

FSME-Viren stellen die wichtigsten durch Zecken übertragenen viralen Erreger in Europa dar. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die aktuelle FSME-Virus-Prävalenz in *Ixodes ricinus* in Endemiegebieten zu ermitteln. Die detektierten Viren wurden mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analysen charakterisiert, um Daten über die in Süddeutschland verbreiteten FSME-Virus-Stämme zu gewinnen.

Im Jahr 2007 wurden in Deutschland ungewöhnlich viele Hantavirus-Erkrankungen gemeldet. Um zu überprüfen, ob sich die große Zahl humaner Erkrankungen in einer hohen Virusprävalenz der Reservoirwirte widerspiegelt, wurde die Hantavirusprävalenz in Nagern in einem Hochendemiegebiet (Schwäbsche Alb) bestimmt.

Das Klima hat als abiotischer Faktor großen Einfluss auf Zecken und Nager und damit auch auf die Naturherde der hier untersuchten Krankheitserreger. Ziel dieser Arbeit war es, grundlegende Daten zur Verbreitung und Häufigkeit humanpathogener

Erreger in Naturherden zu erheben. Eine solche Datenbasis ist notwendig, um in Zukunft den Einfluss von Klimaveränderungen auf die hier behandelten Zoonosen beurteilen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 MATERIAL

2.1.1 Zecken

Für die Untersuchung auf Pathogene wurden freilebende, wirtssuchende Zecken (*Dermacentor* spp. und *Ixodes ricinus*) mit Hilfe einer Zeckenfahne gesammelt. Dabei handelt es sich um ein T-förmiges Holzgestell, an dem ein 80x80 cm großes Mollton- oder Flanell-Tuch befestigt ist (Abb. 22). Dieses Tuch wird im jeweiligen Habitat der Zecken über die Vegetation gezogen. Wirtssuchende Zecken bleiben am Tuch hängen und werden mit Hilfe einer Pinzette in Glasflaschen überführt.

Die gesammelten Zecken wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C eingefroren.



Abb. 22: Zeckenfahne

2.1.1.1 *Dermacentor* spp.

Zecken der Gattung *Dermacentor* (*Dermacentor marginatus* und *D. reticulatus*) wurden im Rhein- und Kinzigtal gesammelt, da zumindest das Verbreitungsgebiet von *D. marginatus* nach bisheriger Kenntnis auf diese Gebiete beschränkt ist. Es wurden vorrangig Regionen gewählt, die als Endemiegebiete für Q-Fieber gelten.

Das bevorzugte Habitat für *D. marginatus* stellen freie Wiesenflächen mit starker Sonneneinstrahlung dar, während *D. reticulatus* auch in Laub- und Mischwäldern zu finden ist. Die Hauptaktivitätszeit beider Arten liegt in den Monaten März bis Mai. Zusätzlich zu den Freilandzecken wurden *Dermacentor* spp. untersucht, die in verschiedenen Gebieten Süddeutschlands von Tieren abgesammelt und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurden (Tab. 6).

Tab. 6: Sammelgebiete der untersuchten *Dermacentor* spp.

Sammelort	Landkreis	abgesammelt von Vegetation/Wirt
Efringen-Kirchen	Lörrach	Vegetation
Istein	Lörrach	Vegetation
Kinzigtal	Ortenau	Vegetation
Freiburg im Breisgau	Freiburg	Vegetation
Kleinostheim	Aschaffenburg	Vegetation
Eggenstein	Karlsruhe	Vegetation/Wirt ^{*1}
Karlsruhe	Karlsruhe	Vegetation/Wirt ^{*1}
Graben-Neudorf	Karlsruhe	Vegetation ^{*1}
Leinfelden-Echterdingen	Esslingen	Vegetation ^{*2}
Filderstadt	Esslingen	Wirt ^{*2}
Köln	Köln	Wirt ^{*3}
Bad Dürkheim	Bad Dürkheim	Wirt ^{*1}
Bad Krozingen	Breisgau-Hochschwarzwald	Wirt ^{*1}
Rheinmünster	Rastatt	Wirt ^{*1}
Bienwald	Germersheim	Wirt ^{*1}

*Zur Verfügung gestellt von (1) Jasmin Skuballa und Dr. Trevor Petney, KIT Karlsruhe; (2) Kathrin Schönfelder, Universität Hohenheim; (3) Dr. Gabriele Liebisch, Zecklab, Köln

2.1.1.2 *Ixodes ricinus*

Die Sammelorte für *Ixodes ricinus*, die auf FSME-Viren untersucht wurden, wurden nach verschiedenen Kriterien bestimmt. Zum einen wurden Orte gewählt, für die bereits in den letzten 10 Jahren FSME-Virus-Befallsraten der Zecken ermittelt wurden, was einen Vergleich aktueller und zurückliegender Daten ermöglichen sollte. Zum anderen wurden Gebiete ausgewählt, in denen die Zahl humaner FSME-Erkrankungen sehr hoch ist (Tab. 7).

I. ricinus bevorzugt Laub- und Mischwälder mit krautigem Unterwuchs und laubreichem Boden. Lufttemperaturen von 20-25 °C sowie hohe Luftfeuchtigkeit (70-80%) stellen optimale Bedingungen zum Sammeln von *I. ricinus* dar.

Tab. 7: Sammelgebiete der untersuchten *I. ricinus*

Sammelgebiet	Landkreis	Auswahlkriterium
Bodanrück	Konstanz	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Botnang	Stuttgart	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Gengenbach	Ortenau	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Großbottwar	Ludwigsburg	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Hagnau	Bodenseekreis	hohe Zahl an FSME-Erkrankungen (Robert-Koch-Institut, SurvStat, Datenstand: 16.12.2009)
Hausach (Ortsteile Hechtsberg, Gechbach, Hausach)	Ortenau	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Hödinger Tobel	Bodenseekreis	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)
Oberprechtal *	Emmendingen	hohe Zahl an FSME-Erkrankungen (Robert-Koch-Institut, SurvStat, Datenstand: 16.12.2009)
Pulverdinger Holz	Ludwigsburg	Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken vorhanden (Oehme et al., 2002)

* Bei diesem Gebiet handelte es sich um einen Nadelwald mit geringer Bodenvegetation

2.1.2 Nager

2.1.2.1 Fang

Neben Zecken sollten in dieser Arbeit Nager als mögliche Wirte für zeckenübertragene Pathogene sowie als Überträger von Hantaviren untersucht werden. Für den Nachweis von *C. burnetii* und *Rickettsia* spp. wurden Feldmäuse (*Microtus arvalis*) und Schermäuse (*Arvicola terrestris*), zur Bestimmung der Prävalenz von Hantaviren dagegen Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) gefangen.

Feld- und Rötelmäuse wurden mit handelsüblichen Totschlagfallen aus Stahl gefangen, da diese Methode ein geringeres Infektionsrisiko birgt als der Fang mit

Lebendfallen und der Transport der lebenden Tiere. Als Köder diene eine Mischung aus Erdnussbutter und Haferflocken. Bei den Schermäusen war ein Fang mit Totschlagfallen nicht möglich; hier kamen Lebendfallen, sogenannte Röhrenfallen, zum Einsatz.

Die Fangmethode wurde unterschiedlich variiert, um sie dem Habitat und der Lebensweise der zu fangenden Nagerarten anzupassen.

Die bevorzugten Habitate von ***Microtus arvalis*** sind freie, baumlose Wiesen- oder Feldflächen. Die Tiere leben in unterirdischen Höhlen, die durch ein überirdisches, meist deutlich sichtbares Wegenetz miteinander verbunden sind. Dies ermöglicht ein gezieltes Fangen von Feldmäusen mit nur geringem Beifang. Dazu wurden die Fallen direkt vor den Eingängen der Wohnhöhlen sowie auf oberirdischen Laufgängen platziert, sofern diese zu erkennen waren. An jedem Sammelort wurden 50-200 Fallen gestellt, über Nacht im Fanggebiet belassen und am nächsten Vormittag kontrolliert. In Gebieten mit gutem Fangerfolg wurden die Fallen für eine weitere Nacht fängig gemacht. Die Tiere wurden einzeln in Plastikbeutel überführt und bis zur Sektion bei -20°C eingefroren.

Im ersten Untersuchungsjahr kamen zudem Lebendfallen zum Einsatz, die ebenfalls mit einer Mischung aus Erdnussbutter und Haferflocken beködert und gezielt auf Laufgängen gestellt wurden. Zusätzlich wurden diese Fallen mit Apfelstücken versehen, um gefangene Tiere mit Flüssigkeit zu versorgen, was die Überlebenschance bis zum nächsten Morgen erhöht. Gefangene Tiere wurden lebend ins Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim transportiert, dort sofort mit Chloroform getötet und sezziert.

Arvicola terrestris bevorzugt wie die Feldmaus freie, baumlose Wiesen- oder Feldflächen, lebt aber fast ausschließlich in unterirdischen Höhlensystemen; daher müssen die Fallen in die unterirdischen Gänge eingegraben werden. Hierbei gilt es vor allem, das versehentliche Fangen der unter Naturschutz stehenden Maulwürfe zu vermeiden, deren Bauten leicht mit Schermaus-Bauten verwechselt werden können. In Tab. 8 sind einige Merkmale zur Unterscheidung von Schermaus- und Maulwurfsbauten angegeben. Aufgrund dieser Verwechslungsgefahr wurde beim Schermausfang auf Lebendfallen, sogenannte Röhrenfallen, zurückgegriffen. Dies sind Kunststoffröhren mit beweglichen Metallplatten an jedem Ende, die ein

Hineinlaufen der Tiere in die Falle ermöglichen, ein Herauslaufen jedoch verhindern. Beim Einsetzen der Fallen in die Gänge ist darauf zu achten, dass die Tiere die Falle nicht umgehen, sondern nur durch sie hindurchlaufen können. Aufgrund der gezielten Fangmethode sind beim Schermausfang keine Beifänge zu erwarten. Da die Fallen sehr eng sind und den Tieren vor allem bei Kälte oder Regen kaum Überlebenschancen bieten, wurden die Schermausfallen nicht über Nacht im Fanggebiet belassen, sondern jeweils am Abend des Fangtages kontrolliert und entfernt. Gefangene Tiere wurden lebend ins Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim transportiert, dort mit Chloroform getötet und sofort seziert.

Tab. 8: Merkmale zur Unterscheidung von Schermaus- und Maulwurfsbauten (nach Dieterlen, 2005c; verändert).

Merkmal	Schermaus	Maulwurf
<i>Erdhaufen</i>		
Form	flach, unregelmäßig	hoch, rund bis kegelförmig
Anordnung	2-3 große und viele kleine Haufen	gleichgroße Haufen in regelmäßigen Abständen
aufgeworfene Erde	sehr fein	gröber
Besonderheiten	oft mit Wurzelresten vermischt	nur Erde
<i>Gang</i>		
Lage	meist 10-20cm neben dem Haufen	unter dem Haufen
Besonderheiten	Gangsohle rau, Gangdecke fest, meist frei von Wurzeln	Gangsohle glatt, Gangdecke lose, Wurzelfasern im Gang
<i>Sonstiges</i>		
Vorratskammern	viele Kammern mit Wurzeln, Zwiebeln etc.	selten zu finden
Umgebung des Baus	Kahlstellen, welkende/vergilbte Pflanzen, Fraßschäden	keine Fraßstellen

Myodes glareolus kommt vor allem an Waldrändern mit dichtem Unterwuchs vor. Ein gerichteter Fang der Tiere ist nicht möglich, da im selben Habitat weitere Nagerarten vorkommen und Rötelmäuse keine deutlich identifizierbaren Wegenetze nutzen. Die Fallen wurden daher in parallelen Reihen aus je fünf Fallen ausgelegt, die im Abstand von ca. 10m vom Waldrand ausgehend in den Wald hinein gelegt wurden. Um das Auffinden der Fallen zu erleichtern, wurde jede Reihe mit einem Absperrband markiert. Die Fallen wurden über Nacht im Fanggebiet belassen und

am folgenden Vormittag kontrolliert. Die Tiere wurden einzeln in Plastikbeutel überführt und bis zur Sektion bei -20°C eingefroren. Der Fangerfolg erwies sich als deutlich geringer als beim gerichteten Feldmausfang; zudem waren sehr viele Beifänge zu verzeichnen.

Tab. 9 gibt einen Überblick über die Sammelorte der Nager sowie die jeweils identifizierten Arten.

Tab. 9: Fangorte und Identität der untersuchten Nager. Beifänge sind mit einem Stern markiert.

Fangort	Landkreis	Arten
Kinzigtal	Ortenau	<i>Microtus arvalis</i> <i>Arvicola terrestris</i>
Efringen-Kirchen	Lörrach	<i>Microtus arvalis</i> <i>Apodemus</i> spp. * <i>Sorex</i> spp. *
Römerstein	Reutlingen	<i>Myodes glareolus</i> <i>Microtus arvalis</i> * <i>Apodemus</i> spp. * <i>Sorex</i> spp. *
Westerheim	Alb-Donau-Kreis	<i>Myodes glareolus</i> <i>Microtus arvalis</i> * <i>Apodemus</i> spp. *

2.1.2.2 Sektion

Die Sektion der Nager fand im S2-Labor des Fachgebiets Parasitologie der Universität Hohenheim statt. Zum Schutz vor Infektionen wurde neben der üblichen Schutzkleidung eine Atemmaske getragen, zudem wurden alle Arbeiten an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde das Sektionsbesteck vor jeder Sektion mit Alkohol abgeflammt.

Eingefrorene Tiere wurden über Nacht im Kühlraum bei 4°C aufgetaut. Für jedes Tier wurde zunächst die Art bestimmt, zudem wurden die Kopf-Rumpf-Länge, die Schwanzlänge sowie, wenn möglich, das Geschlecht ermittelt.

Für die Sektion wurde das Tier mit dem Bauch nach oben auf einer mit Alufolie überzogenen Korkplatte fixiert und zur Desinfektion mit 70%igem Alkohol besprüht.

Anschließend wurde die Bauchhaut vom After bis zum Hals geöffnet. Zur Gewinnung des Transsudats wurde der Brustraum geöffnet und mit 1ml PBS (Phosphat buffered saline = Phosphatpuffer) gespült; die Spülflüssigkeit wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -70°C eingefroren.

Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und Organproben von Lunge, Leber, Milz und Niere entnommen. Die Proben wurden in Eppendorfgefäße mit jeweils 200µl Guanidinisothiocyanat-Puffer überführt. Sämtliche Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

Lebendgefangene Tiere (Schermäuse und einige Feldmäuse) wurden mit Chloroform getötet. Anschließend wurde der Brustraum eröffnet und mittels Herzpunktion Blut entnommen. Die weitere Sektion wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben zunächst etwa eine halbe Stunde bis zur vollständigen Gerinnung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 Minuten bei 2000g zentrifugiert, um Serum und Blutkuchen zu trennen. Die Seren wurden in Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C eingefroren.

2.1.3 Patientenseren

Humanseren, die im Jahr 2007 im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg im Rahmen der Routine-Diagnostik serologisch auf Hantavirus-Antikörper untersucht wurden, wurden molekularbiologisch auf Hantaviren des Typs Puumala untersucht.

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 Nukleinsäure-Extraktion

Die in dieser Arbeit verwendeten Aufreinigungsmethoden für Nukleinsäuren (DNA/RNA) beruhen auf der Bindung von DNA an Silikapartikel (Boom et al., 1990).

Die aufzureinigenden Proben werden zunächst mit einem Lysepuffer mit niedrigem pH-Wert und hoher Salzkonzentration versetzt. Dieser Puffer enthält Guanidinisothiocyanat, das Proteine denaturiert und Nukleasen inaktiviert; auf diese Weise werden die Nukleinsäuren aus den Proben freigesetzt. Zudem enthält der Lysepuffer chaotrope Salze, welche die Wasserstruktur verändern und auf diese Weise die Hydrathüllen negativ geladener Moleküle zerstören. Die Kationen aus dem Puffer bilden eine „Brücke“ zwischen den negativ geladenen Nukleinsäuren und der ebenfalls negativ geladenen Oberfläche der Silikapartikel, was zu einer reversiblen Bindung führt. In einer Reihe von Waschschritten werden die Silikapartikel anschließend von Proteinen und anderen Zellbestandteilen gereinigt. Im letzten Schritt werden die Nukleinsäuren mit Hilfe eines Elutionspuffers, der eine geringe Salzkonzentration aufweist, von den Silikapartikeln eluiert.

Durch die Verwendung von magnetischen Silikapartikeln kann die Aufreinigung vollautomatisch erfolgen. Hierzu wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Geräte verwendet, deren Arbeitsweisen im Folgenden kurz beschrieben werden.

Im Fall des **Maxwell™ 16 (Promega)** werden Kartuschen verwendet, die aus mehreren Kammern bestehen. Mit Hilfe eines magnetischen Stößels werden die Proben zunächst vollautomatisch in einem Lysepuffer homogenisiert; auf diese Weise können neben flüssigen auch feste Probenmaterialien wie Zecken oder Gewebestücke aufgereinigt werden. Die magnetischen Silikapartikel werden mit der homogenisierten Probe inkubiert, sodass die DNA an die Partikel bindet. Anschließend werden die Silikapartikel mit der gebundenen DNA durch den magnetischen Stößel zunächst in Kammern mit Waschpuffer und zuletzt in ein Gefäß mit Elutionspuffer überführt.

Im Gegensatz dazu können mit dem **NucliSens®easyMAG (Biomérieux)** ausschließlich flüssige Probenmaterialien aufgereinigt werden, da hier keine mechanische Zerkleinerung fester Materialien möglich ist. Die Aufreinigung der

Proben findet in speziellen Probengefäßen statt. Nach Inkubation mit dem Lysepuffer werden die magnetischen Silikapartikel zugegeben, an die die Nukleinsäuren binden. Während der folgenden Waschvorgänge hält ein Magnet die Silikapartikel mit den gebundenen Nukleinsäuren an der Wand des Gefäßes fest. Im letzten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem Elutionspuffer; anschließend können die Eluate in Eppendorfgefäße überführt werden.

2.2.2 Prinzip der PCR

Mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) können spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Diese Methode ähnelt der natürlichen DNA-Replikation, die in jeder Zelle abläuft. Dazu werden kurze Oligonukleotide, sogenannte Primer, eingesetzt, die zu DNA-Bereichen an beiden Enden der template-DNA komplementär sind. Sie dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase als Startsignal für die Synthese eines komplementären DNA-Strangs. Für die Synthese werden zudem Desoxynukleotide (dNTPs: dATP, dTTP, dGTP, dCTP) benötigt. Die PCR läuft in aufeinanderfolgenden Zyklen ab, die jeweils aus drei Teilschritten (Denaturierung, Annealing und Elongation) bestehen.

Während der **Denaturierung** werden die Doppelstränge der Ausgangs-DNA in Einzelstränge getrennt. Dazu werden die Proben auf 94-95°C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Basen der Doppelstränge zerstört werden. Für das anschließende **Annealing** werden die Proben auf 50-60°C, abhängig von den spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Primer, abgekühlt. Die Primer binden nun an die komplementären Bereiche der Ziel-DNA. In der folgenden **Elongationsphase** wird die Temperatur auf 72°C erhöht, was dem Temperatur-Optimum der DNA-Polymerase entspricht. Diese synthetisiert nun, ausgehend von den Primern, die zur template-DNA komplementären DNA-Stränge. Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation wird 25-40mal wiederholt, wobei sich die Zahl der Amplifikate in jedem Zyklus exponentiell erhöht. Zur Detektion der DNA wird im Anschluss an die PCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Die **nested PCR** („geschachtelte PCR“) stellt eine Modifikation der klassischen PCR dar, mit der sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Methode gesteigert werden können. In diesem Fall werden zwei aufeinanderfolgende PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei die Primer der zweiten innerhalb des Amplifikationsprodukts der

ersten PCR binden. Auf diese Weise wird die Sensitivität des Nachweises erhöht, da die in der ersten PCR entstandenen Produkte im zweiten Lauf nochmals vervielfältigt werden. Weiterhin nimmt die Spezifität zu, da die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Amplifikationen durch die zweite PCR deutlich verringert wird.

Handelt es sich bei der zu amplifizierenden Nukleinsäure-Sequenz um RNA, so wird vor der eigentlichen PCR eine **reverse Transkription** durchgeführt. Dabei wird die RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die wiederum als template-DNA für die PCR dient.

2.2.3 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese

Zur Detektion von PCR-Amplifikaten wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden DNA-Fragmente elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, da größere Fragmente langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Um die DNA sichtbar zu machen, wird dem Gel Ethidiumbromid hinzugefügt, das unspezifisch in DNA-Doppelstränge interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Die Größe der PCR-Amplifikate kann durch den Vergleich mit einer Positivkontrolle oder mit Hilfe eines DNA-Standards, der Fragmente definierter Größe enthält, bestimmt werden.

2.2.4 Prinzip der realtime-PCR

Die realtime-PCR stellt eine zeitsparende Alternative zur herkömmlichen PCR auf einem Blockcycler dar. Bei dieser Methode werden die gebildeten Amplifikate schon während des Laufs mit Hilfe eines Lasers detektiert, was durch die Verwendung von fluoreszierenden Sonden ermöglicht wird. Die Stärke der detektierten Fluoreszenz ist dabei abhängig von der Menge der in der PCR gebildeten DNA, sodass zudem eine Quantifizierung der PCR-Produkte möglich ist.

Für die Durchführung einer realtime-PCR stehen verschiedene Geräte zur Verfügung. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten LightCycler der Firma Roche werden Glaskapillaren als Probengefäße verwendet, die eine Probenmenge von 20µl aufnehmen können. Die Oberfläche der Kapillaren ist im Verhältnis zu ihrem Volumen sehr groß, sodass sich die Temperatur der Proben sehr schnell und gleichmäßig ändern lässt. Temperaturänderungen erfolgen beim LightCycler mit Hilfe von Luft, die durch eine Heizspirale erwärmt und durch einen Ventilator in der

Probenkammer verteilt wird. Auf diese Weise kann die Temperatur in der Probenkammer sehr schnell variiert werden (20°C/s beim Aufwärmen oder Abkühlen), sodass ein PCR-Lauf nur etwa 45-60 Minuten dauert.

Zur Visualisierung der DNA-Amplifikation werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die mit Hilfe eines Lasers mit einer Wellenlänge von 470nm angeregt werden. Mit Hilfe von optischen Einheiten, die Licht der Wellenlängen 530nm, 640nm und 710nm detektieren, wird das emittierte Licht erfasst. Die erhaltenen Daten werden an einen angeschlossenen Computer übertragen, an dem die graphische Darstellung und Auswertung der Ergebnisse erfolgt.

Es existieren verschiedene Arten von Fluoreszenzfarbstoffen, die in der realtime-PCR verwendet werden können. Die einfachste Methode stellt die Zugabe des Farbstoffs SYBRGreen zum PCR-Reaktionsgemisch dar. Dieser Farbstoff interkaliert, ähnlich wie Ethidiumbromid bei einer Agarose-Gelelektrophorese, in DNA-Doppelstränge. SYBRGreen fluoresziert ausschließlich, wenn es an DNA gebunden ist; die Fluoreszenz wird jeweils am Ende der Elongationsphasen detektiert. Da dieser Farbstoff allerdings sequenzunabhängig in alle vorliegenden DNA-Doppelstränge interkaliert, können mit dieser Methode spezifische Produkte nicht von unspezifischen unterschieden werden.

Die Verwendung von sequenzspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden (= kurze Oligonukleotide) stellt hingegen zugleich eine Spezifitätskontrolle der PCR dar. Die Fluoreszenz dieser Sonden beruht auf einem als FRET (fluorescence resonance energy transfer) bezeichneten Vorgang. Dabei gibt ein Farbstoff nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge an einen zweiten Farbstoff ab, der sich in unmittelbarer Nähe befindet. Dieser zweite Farbstoff emittiert wiederum Licht einer anderen Wellenlänge. Dieses Prinzip kann auf zwei Arten umgesetzt werden.

Im Falle von Hybridisierungssonden werden zwei Sonden verwendet, die während des Annealings benachbart (mit höchstens 1-5bp Abstand) an Zielsequenzen auf dem Amplifikat binden. Am 3'-Ende der einen Sonde befindet sich ein Donor-Fluorochrom, das seine Emissionsenergie an das Akzeptor-Fluorochrom am 5'-Ende der zweiten Sonde weitergibt, sobald beide Sonden in räumlicher Nähe an den DNA-Strang gebunden haben. Das Akzeptor-Fluorochrom emittiert wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge, das von den optischen Einheiten im LightCycler detektiert wird.

Bei der Verwendung von TaqMan-Sonden wird dagegen die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase ausgenutzt. In diesem Fall befindet sich ein Farbstoff am 3'-Ende, der andere am 5'-Ende einer einzigen Sonde, die während des Annealings an die komplementäre Zielsequenz der DNA bindet. Einer der beiden Farbstoffe dient dabei als Reporter, der andere als Quencher. Solange die Sonde an die DNA gebunden ist, gibt der Reporter seine Emissionsenergie an den Quencher weiter, der die Energie gewissermaßen „schluckt“ und nicht emittiert. Sobald die DNA-Polymerase bei der Synthese des komplementären DNA-Strangs auf die TaqMan-Sonde stößt, wird diese durch die Exonukleaseaktivität des Enzyms von der DNA abgespalten. Dabei werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass das vom Reporter emittierte Licht nicht mehr „geschluckt“ wird und somit von den Detektoren gemessen werden kann.

Der Ct-Wert gibt den PCR-Zyklus an, ab dem die Fluoreszenz einer Probe die unspezifische Hintergrundfluoreszenz übersteigt und somit messbar wird. Die Höhe des Ct-Werts ist abhängig von der Menge an Ziel-DNA in der Probe. Bei einer großen Menge an Ziel-DNA in der Probe ist der Ct-Wert niedrig, d.h. die Fluoreszenz wird bereits in einem frühen Zyklus messbar; bei geringen Mengen an Ziel-DNA verhält es sich umgekehrt.

Da die Oligonukleotid-Sequenzen der Hybridisierungs- und TaqMan-Sonden komplementär zu einem Teilstück des in der PCR gebildeten Produkts sind, binden sie nur an spezifische, nicht jedoch an unspezifische PCR-Produkte und stellen somit eine zuverlässige Spezifitätskontrolle der realtime-PCR dar.

2.2.5 Prinzip der DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate erfolgte nach der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al, 1977). Diese gliedert sich in vier Teilschritte: Aufreinigung der PCR-Amplifikate, „Cycle sequencing“, Aufreinigung der Sequenzierprodukte und Trennung der Produkte durch Kapillargelelektrophorese.

Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Zunächst müssen die zu sequenzierenden PCR-Amplifikate aufgereinigt werden, um möglichst reine DNA-Proben zu erhalten. Verunreinigungen durch Primer, aber auch Salze, Nukleotide und DNA-Polymerase aus den PCR-Reaktionen würden die Sequenzierung negativ beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Aufreinigung mit Hilfe von Säulen, die eine Silikamembran enthalten. Diese adsorbiert bei hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert von $\leq 7,5$ DNA-Fragmente, wohingegen Verunreinigungen nicht an die Membran binden und somit in mehreren aufeinanderfolgenden Waschschritten entfernt werden können. Die abschließende Elution der DNA erfolgt bei niedriger Salzkonzentration und einem pH-Wert von 7-8,5.

Cycle sequencing

Im anschließenden „Cycle sequencing“, das die eigentliche Sequenzierreaktion darstellt, werden die gereinigten PCR-Produkte amplifiziert und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Hierfür werden dem Reaktionsansatz neben Nukleotiden auch basenanaloge Didesoxy-Nukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) beigemischt. Diese „Abbruchbasen“ besitzen keine Hydroxyl-Gruppe am 3'-Ende und können somit keine Phosphodiester-Bindungen mit einem weiteren Nukleotid eingehen. Daher bricht die Elongation ab, sobald die DNA-Polymerase ein Didesoxy-Nukleotid in den neu synthetisierten Strang einbaut. Auf diese Weise entstehen im Cycle Sequencing DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit einer Abbruchbase enden. Die vier Didesoxy-Nukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die sich in ihrem Emissionsspektrum unterscheiden, d.h. Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Sie können daher mit Hilfe eines Lasers und eines Detektors identifiziert werden. Im Gegensatz zur PCR wird beim Cycle sequencing in jedem Reaktionsansatz nur ein Primer (forward oder reverse) eingesetzt. Bei der für die Sequenzierung verwendeten Polymerase handelt es sich um das Stoffel-Fragment der Taq-Polymerase. Dieses besitzt keine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, sodass ein teilweiser Abbau der gebundenen Primer verhindert wird. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass alle DNA-Fragmente einen durch den Primer definierten Anfang und durch die Abbruchbasen definiertes Ende besitzen, sodass Fragmente derselben Länge immer mit demselben Fluoreszenzfarbstoff markiert sind.

Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Im Anschluss an das Cycle Sequencing werden die Proben zunächst mit SDS versetzt und denaturiert. Durch die Behandlung mit SDS werden „Farbstoffklumpen“, die durch Aneinanderlagerung von ungebundenen Didesoxy-Nukleotiden entstehen

können, aufgelöst, sodass die ungebundenen ddNTPs in der folgenden Aufreinigung entfernt werden können. Auf diese Weise wird die Hintergrundfluoreszenz verringert und das Ergebnis der Sequenzierung verbessert.

Die Sequenzierprodukte müssen anschließend erneut aufgereinigt werden, um überschüssige, nicht eingebaute ddNTPs zu entfernen. Diese würden in der anschließenden Kapillargelelektrophorese zu unerwünschter Hintergrundfluoreszenz führen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte diese Aufreinigung mittels Gelfiltration, bei der überschüssige ddNTPs im Gel zurückgehalten werden, während DNA-Fragmente, die eine Länge von mehr als 16bp aufweisen, ungehindert durch das Gel fließen.

Kapillargelelektrophorese

Im Anschluss daran erfolgt die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente mit Hilfe einer Kapillargelelektrophorese. Hierbei wird ein Polyacrylamid-Gel durch eine Kunststoffkapillare gepumpt. Die Proben werden in diesem Gel elektrophoretisch bei 15000V nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei kürzere Stücke schneller durch das Gel wandern als längere. Die DNA-Fragmente passieren dabei einen gläsernen Bereich, durch den ein Laserstrahl geschickt wird, welcher die Fluoreszenzfarbstoffe der Didesoxy-Nukleotide anregt. Die emittierten Lichtsignale werden von Photozellen detektiert und an einen Computer übermittelt, der die Fluoreszenzsignale in die zugehörigen Basenabfolgen umrechnet und grafisch darstellt.

Datenbankrecherche

Die erhaltenen Sequenzen werden nachgelesen und eventuell korrigiert; anschließend werden sie im Fasta-Format mit in der Gendatenbank vorhandenen Sequenzen verglichen.

2.2.6 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Die dargestellten PCR-Methoden sind sehr sensitive Verfahren zum Nachweis und zur Vermehrung der DNA. Kontaminationen, die zu falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen führen können, stellen daher ein großes Problem dar. Dies gilt insbesondere für die nested-PCR, bei der die Sensitivität im Vergleich zu einer einfachen PCR deutlich erhöht ist.

Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden eine Reihe von Vorkehrungen getroffen. So fanden die DNA-Isolierung, das Herstellen des PCR-Mix, die Zugabe der Proben sowie PCR und Gelelektrophorese in vier voneinander getrennten Räumen statt. Für die Zugabe der Amplifikate zur nested-PCR stand ein weiterer Raum zur Verfügung. Das Verwenden von gestopften Spitzen verringerte das Kontaminationsrisiko beim Pipettieren zusätzlich. Weiterhin wurde bei der Aufbewahrung der Proben auf die räumliche Trennung von DNA-Isolaten und Amplifikaten geachtet. Sämtliche Pipettierschritte fanden unter mit UV-Licht ausgestatteten Werkbänken statt. Mit Hilfe des UV-Lichts können eventuelle DNA-Kontaminationen zerstört werden. Durch das Portionieren der Reagenzien in kleine Mengen sollte eine Kontamination der Vorratslösungen vermieden werden.

Zur Überprüfung der PCR wurden generell in jedem Lauf positive und negative Kontrollen mitgeführt. Mit Hilfe der positiven Kontrolle kann überprüft werden, ob die PCR-Reaktion einwandfrei ablief, während die negative Kontrolle, bei der statt DNA Wasser zum Mix gegeben wird, dazu dient, die verwendeten Reagenzien auf Kontaminationen zu überprüfen.

Die hier beschriebenen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen sowie das Mitführen der Kontrollen wurden bei allen in dieser Arbeit beschriebenen PCR-Verfahren eingehalten.

2.3 SEROLOGISCHE METHODEN

Beim serologischen Nachweis von Antikörpern muss zwischen IgM- und IgG-Antikörpern unterschieden werden. IgM-Antikörper werden sehr schnell nach Beginn einer Infektion gebildet, bleiben jedoch nur für kurze Zeit im Serum vorhanden. Die Bildung von IgG-Antikörpern beginnt dagegen erst in einem späteren Stadium der Infektion. Antikörper dieser Klasse sind auch im Anschluss an die Infektion noch über längere Zeit im Serum nachweisbar. Da mit der hier durchgeführten Untersuchung auch zurückliegende Infektionen der Nager überprüft werden sollten, wurde in allen Fällen der Nachweis von IgG-Antikörpern durchgeführt.

2.3.1 Prinzip der Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) zum Nachweis spezifischer Antikörper in humanen und tierischen Seren wurde bereits 1901 von Bordet und Gengou entwickelt. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass Erreger-Antigene mit spezifischen Antikörpern Antigen-Antikörper-Komplexe ausbilden, die das bluteigene Komplementsystem aktivieren, indem sie Komplementkomponenten binden. Diese gebundenen Komponenten stehen somit nicht für weitere Aktivierungs- und Bindungsvorgänge zur Verfügung. Da die Komplementbindung selbst nicht sichtbar ist, wird zu ihrem Nachweis ein Indikatorsystem, das sogenannte hämolytische System, eingesetzt. Dieses besteht aus Schaferythrozyten und gegen sie gerichteten Antikörpern aus Kaninchenserum, die als Ambozeptor bezeichnet werden. Schaferythrozyten und Ambozeptor bilden ebenfalls einen Antigen-Antikörper-Komplex aus, der wiederum in der Lage ist, Komplementkomponenten zu binden. Diese Bindung führt zur Hämolyse der Erythrozyten.

Das probeneigene hitzelabile Komplement muss vor der Durchführung der KBR durch Inkubation bei 56°C inaktiviert werden. Die inaktivierten Proben werden in Mikrotiterplatten mit dem Antigen inkubiert. Sind in einer Probe Antikörper vorhanden, so bilden diese mit den Antigenen Komplexe aus und verbrauchen das Komplement, welches in einem weiteren Schritt hinzugegeben wird. Somit sind keine Komplementkomponenten mehr vorhanden, die im weiteren Testverlauf an den Komplex aus Schaferythrozyten und Ambozeptor binden könnten, d.h. es findet keine Hämolyse statt. In negativen Proben können sich dagegen keine Antigen-Antikörper-Komplexe ausbilden, das Komplement bleibt frei und bindet im nächsten

Schritt an den Schaferythrozyten-Ambozeptor-Komplex, was zur Hämolyse der Erythrozyten führt. Durch einen Zentrifugationsschritt am Ende des Tests setzen sich nicht-hämolytierte Erythrozyten am Boden der Vertiefungen der Mikrotiter-Platten ab und bilden sogenannte „Knöpfchen“. Je schwächer diese Knöpfchen ausgeprägt sind, desto stärker war die Hämolyse; bei starker oder kompletter Hämolyse kann von einer negativen Probe ausgegangen werden.

2.3.2 Prinzip des ELISA

Dem Nachweis von spezifischen Antikörpern mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) liegt eine Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde, die über eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion sichtbar gemacht wird. Für die Untersuchung werden Mikrotiterplatten verwendet, in deren Vertiefungen Antigene fixiert sind. Die zu untersuchenden Seren werden in diesen Vertiefungen inkubiert, sodass in den Proben vorhandene Antikörper mit den fixierten Antigenen reagieren. In einem Waschschrift werden ungebundene Antikörper entfernt. Anschließend werden enzymgekoppelte sekundäre Antikörper (= Konjugat) zugegeben, die an die Fc-Teile der gebundenen Serumantikörper binden. Nach einem weiteren Waschschrift, in dem ungebundenes Konjugat entfernt wird, wird ein Substrat zugegeben, das durch das Enzym des Konjugats in ein farbiges Produkt umgewandelt wird. Nach Inkubation mit dem Substrat erfolgt daher ein Farbumschlag. Die Intensität der Färbung wird photometrisch bei einer substratabhängigen Wellenlänge gemessen; sie ist proportional zur Menge der Antikörper im Serum. Es können verschiedene Enzym-Substrat-Kombinationen verwendet werden, beispielsweise Peroxidase und Tetra-Methyl-Benzidin (TMB) oder alkalische Phosphatase und para-Nitrophenylphosphat.

2.3.3 Prinzip des indirekten Immunfluoreszenztests

Der Nachweis spezifischer Antikörper mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT) basiert, ebenso wie der ELISA, auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Beim IIFT wird diese Reaktion jedoch nicht biochemisch, sondern mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. Zunächst wird das zu untersuchende Serum mit dem Antigen inkubiert. Hierfür werden Objektträger verwendet, auf denen in mehreren Auftragsstellen Erreger-Antigene in Form von

isolierten Erregern, infizierten Zellen oder Gewebeschnitten fixiert sind. Im Serum enthaltene Antikörper binden an die Antigene. Nach einem Waschschrift, in dem nicht gebundene Antikörper entfernt werden, wird im nächsten Schritt ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper zugegeben. Dieser ist gegen IgG-Antikörper der untersuchten Spezies gerichtet und bindet an deren Fc-Teile. In einem weiteren Waschschrift werden nicht gebundene sekundäre Antikörper entfernt.

In den meisten Fällen wird Fluorescein (FITC = Fluorescein-Isothiocyanat) als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser Farbstoff absorbiert nach Anregung Licht der Wellenlänge 500nm, das Emissionsmaximum liegt bei 530nm. Nach Anregung des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffs erscheinen die Antigen-Antikörper-Komplexe daher im Fluoreszenzmikroskop leuchtend grün. Um den Kontrast zu erhöhen und damit die Fluoreszenz im positiven Fall besser sichtbar zu machen, kann eine Gegenfärbung mit Evans Blue durchgeführt werden; auf diese Weise zeigen die auf den Objektträgern fixierten Zellen eine kräftig rote Färbung.

2.4 ERREGERNACHWEISE

2.4.1 *Coxiella burnetii*

Um zu überprüfen, ob *C. burnetii* in Naturherden in Süddeutschland verbreitet ist, wurden zum einen Zecken der Gattung *Dermacentor* molekularbiologisch auf Infektionen mit dem Erreger untersucht; zum anderen wurden Nager sowohl molekularbiologisch als auch serologisch getestet.

2.4.1.1 **Molekularbiologischer Nachweis von *C. burnetii***

2.4.1.1.1 *Extraktion von Nukleinsäuren*

Für die Extraktion von Nukleinsäuren sowohl aus Zecken als auch aus Nagerorganen wurde eine automatisierte Aufreinigung mittels MaxwellTM 16 durchgeführt.

Zecken

Dermacentor-Zecken besitzen einen großen und sehr harten Chitin-Schild. Um eine vollständige Homogenisierung und damit eine erfolgreiche Nukleinsäure-Extraktion zu gewährleisten, wurden die Zecken daher zunächst einzeln mit Hilfe einer sterilen Kunststoff-Impföse in 50µl Lysepuffer grob zerkleinert. Dieses grobe Homogenat wurde für die Nukleinsäure-Aufreinigung vollständig in die Lysekammer des Maxwell überführt. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte mit 200µl Elutionspuffer. Die Eluate wurden bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C eingefroren.

Nager

Da bisher nicht bekannt ist, welche Organe für den Nachweis von Coxiellen am besten geeignet sind, wurden Organpools für die Untersuchungen verwendet. Dazu wurden von jedem Tier jeweils 5x5mm große Stücke von Leber, Lunge, Milz und Niere präpariert. Diese wurden in Eppendorfgefäße überführt und in 200µl Lysepuffer mit einem Pistill homogenisiert. Das Homogenat wurde vollständig in die Lysekammer des Maxwell eingesetzt. Die Elution erfolgte mit 200µl Elutionspuffer. Alle Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C eingefroren.

2.4.1.1.2 PCR der IS1111-Region

Für den Nachweis von *C. burnetii* in Zecken und Nagerorganen wurde eine spezifische nested-PCR verwendet. Die Primer, deren Zielsequenz sich innerhalb des repetitiven Elements IS1111 befindet, wurden von Fournier et al. (2003) übernommen; Temperatur und PCR-Profil wurden modifiziert. Die IS1111-Region ist im Genom der Coxiellen in 21 Kopien vorhanden. Dieser Abschnitt eignet sich daher besonders gut für einen sensitiven molekularbiologischen Nachweis der Erreger. Mittels der hier verwendeten ersten PCR wurde ein 485bp langes Fragment amplifiziert; die nested-PCR lieferte ein 260bp langes Amplifikationsprodukt. Die PCR wurde auf einem Blockcycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) durchgeführt.

Als Positivkontrolle dienten Nukleinsäure-Aufreinigungen von *C. burnetii*-Zellkulturüberstand, der eine Konzentration von $1,18 \times 10^7$ Partikeln/ μ l aufwies (Dezfuli, 2006).

Primersequenzen der ersten PCR

IS1111 F1: 5'-TACTGGGTGTTGATATTGC-3'

IS1111 R1: 5'-CCGTTTCATCCGCGGTG-3'

Primersequenzen der nested-PCR

IS1111 F2: 5'-GTAAAGTGATCTACACGA-3'

IS1111 R2: 5'-TTAACAGCGCTTGAACGT-3'

Reaktionsansatz der ersten PCR

Beide PCR-Reaktionen wurden in 50 μ l-Ansätzen durchgeführt.

Der Standard-Mix für die erste PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- 10mM Tris (pH 8,3), 50mM KCl
- 2,5mM MgCl₂
- 40,2mM Tris-Cl (pH 9)
- je 200 μ M dNTPs
- je 0,5 μ M der Primer IS1111 F1 und IS1111 R1
- 1,5 units AmpliTaq DNA Polymerase
- 5 μ l aufgereinigte DNA

Temperaturprofil der ersten PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95°C	95°C	52°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	1min	4min	∞
	40 Zyklen				

Reaktionsansatz der nested-PCR

Der Standard-Mix für die nested-PCR entsprach dem der ersten PCR, es wurden jedoch je 0,5µM der Primer IS1111 F2 und IS1111 R2 eingesetzt sowie 1,5µl des Amplifikationsprodukts der ersten PCR.

Temperaturprofil der nested-PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95°C	95°C	52°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	30s	4min	∞
	30 Zyklen				

2.4.1.1.3 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Zur Detektion der Amplifikationsprodukte der nested-PCR wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden 0,75g Agarose in 50ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend auf ca. 50°C abgekühlt. Nach Zugabe von 10µl einer 0,1%igen Ethidiumbromidlösung wurde das Gel in einen Gelschlitten gegossen und Kämme zur Bildung der Taschen in das noch flüssige Gel eingesteckt. Nach dem Erstarren wurden jeweils 8µl Amplifikat aus der nested-PCR und 2µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 80V für 30-45 Minuten in einer Gelkammer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer UV-Kammer und eines Geldokumentationssystems (BioProfil®, LTF Labortechnik).

2.4.1.1.4 Überprüfung der Eignung von Nagerorganen für die *C. burnetii*-PCR

Um zu überprüfen, ob sich Nagerorgane prinzipiell für den Nachweis von *C. burnetii* mittels PCR eignen, wurden in einem Vorversuch Organproben (5x5 mm große Stücke von Leber, Lunge, Milz und Niere) von Labormäusen präpariert und vor der DNA-Extraktion mit verschiedenen Konzentrationen von *C. burnetii*-Zellkulturüberstand (Friedrich-Löffler-Institut, Wusterhausen) versetzt. Auf diese Weise wurde zugleich die Sensitivität der PCR ermittelt.

Zunächst wurde der Zellkulturüberstand, der eine Konzentration von 10^7 Partikeln/ μ l aufwies (Dezfuli, 2006), mit RNase-freiem Wasser in Zehnerschritten bis zu einer Konzentration von 10^{-1} Partikeln/ μ l verdünnt. Für jedes Organ wurden Proben mit 1 μ l der einzelnen Verdünnungsstufen (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1, 10^{-1} Partikel/ μ l) versetzt, die gespikten Proben wurden mit einem Pistill homogenisiert und in Maxwell-Kartuschen überführt. DNA-Extraktion und PCR wurden wie unter 2.4.1.1.1 und 2.4.1.1.2 beschrieben durchgeführt.

2.4.1.2 serologischer Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der Nagerorgan-Pools auf *C. burnetii* wurden die Seren bzw. Transsudate der Nager serologisch auf das Vorhandensein von *C. burnetii*-Antikörpern untersucht, um auch zurückliegende Infektionen erfassen zu können. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Komplementbindungsreaktion (2.4.1.2.1) durchgeführt. Da sich diese jedoch als ungeeignet für die zur Verfügung stehenden Nagerproben erwies, wurde für die weiteren Untersuchungen ein ELISA (2.4.1.2.2) verwendet.

2.4.1.2.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *C. burnetii* mittels Komplementbindungsreaktion wurde ein für Humanproben entwickelter *Coxiella burnetii* KBR Kit (Virion/Serion) verwendet; der Test wurde sowohl mit Phase I-Antigen als auch mit Phase II-Antigen durchgeführt.

In jedem Ansatz wurden eine Positiv- (KBR-positives Humanserum) und eine Negativkontrolle (fötales Kälberserum) mitgeführt. Zudem wurden für jede Probe Serumkontrollen in zwei Verdünnungsstufen (1:2 und 1:4) in PBS pipettiert, denen kein Antigen zugegeben wurde; auf diese Weise wird überprüft, ob eine

Eigenhemmung vorliegt, d.h. ob das Komplement durch unspezifische Bindungen an Komponenten der Proben verbraucht wird und somit falsch-positive Ergebnisse erzeugt werden. Um im positiven Fall den Antikörper-Titer bestimmen zu können, wurde von jeder Probe eine Verdünnungsreihe (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) getestet.

Testdurchführung

- zentrifugieren der Proben für 10 Minuten bei 2000g
- Inkubation bei 56°C im Wasserbad für 20 Minuten
- Herstellen der benötigten Verdünnungsreihen mit Veronal-Puffer
- je 25µl Positiv- und Negativkontrolle, Serumverdünnungen und Probenverdünnungen in Mikrotiter-Platten pipettieren
- je 25µl Antigen-Verdünnung (1:12 mit Veronal-Puffer) in die Vertiefungen geben
- Serumkontrollen: statt Antigen 25µl Puffer zugeben
- je 25µl Komplement-Verdünnung (1:55 mit Veronal-Puffer) in die Vertiefungen geben
- Platten gut schütteln und bei 4°C über Nacht inkubieren
- Herstellung des hämolytischen Systems: Ambozeptor-Verdünnung (1:2500 mit Veronal-Puffer) und 2%ige Hammelerythrozyten-Lösung im Verhältnis 1:1 mischen
- je 50µl des hämolytischen Systems in jede Vertiefung geben
- bei 37°C ca. 90 Minuten inkubieren
- Platten zentrifugieren
- Auswertung: Beurteilung von Knöpfchenbildung und Hämolyse für jede Vertiefung

2.4.1.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für den Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *C. burnetii* mittels ELISA wurde ein *C. burnetii* ELISA-Kit für Humanproben (*C. burnetii* Phase 2, Virion/Serion) mit einem all species-Konjugat (Immunozytm FSME-Kit, Progen) kombiniert. Bei diesem Konjugat handelt es sich um Peroxidase-gekoppeltes Protein G. Dieses Zellwandprotein von Staphylokokken ist in der Lage, an den Fc-Teil von IgG-Antikörpern verschiedener Tierarten zu binden. Da kein Serum eines mit Coxiellen infizierten Nagers zur

Verfügung stand, diente *C. burnetii*-positives Humanserum als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde fötales Kälberserum (FKS) verwendet.

Die Durchführung des ELISA wurde im Vergleich zu den jeweiligen Herstellerangaben modifiziert.

Testdurchführung

- Proben 1:100 mit Verdünnungspuffer (Progen) verdünnen
- jeweils 100µl Probe bzw. Kontrolle pro Vertiefung zugeben
- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 200µl Waschpuffer (Progen) waschen
- Konjugat 1:100 mit Waschpuffer verdünnen
- jeweils 200µl Konjugatverdünnung pro Vertiefung zugeben
- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 200µl Waschpuffer waschen
- Substrat (Progen) 1:20 verdünnen
- jeweils 200µl Substratverdünnung pro Vertiefung zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- jeweils 50µl Stopplösung pro Vertiefung zugeben und kurz schütteln
- Ablesen der Platten mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450nm

2.4.2 *Rickettsia* spp.

2.4.2.1 Molekularbiologischer Nachweis von *Rickettsia* spp.

Für den molekularbiologischen Nachweis von Rickettsien in *Dermacentor*-Zecken und Nagern wurden DNA-Aufreinigungen von Zecken sowie von Nagerorgan-Pools verwendet (siehe 2.4.1.1.1).

2.4.2.1.1 TaqMan realtime-PCR des *gltA*-Gens

Die TaqMan realtime-PCR wurde für den molekularbiologischen Nachweis von Rickettsien in Zecken und Nagerorganen verwendet.

Die verwendeten Primer wurden von Wölfel et al. (2008) übernommen, Reaktionsansatz und Temperaturprofil wurden jedoch modifiziert. Zielsequenz der Primer und der TaqMan-Sonde ist ein 70bp langes Fragment des Citratsynthase-Gens *gltA*. Diese genusspezifische PCR erfasst neben Rickettsien der Zeckenstichfiebergruppe auch Arten der Fleckfiebergruppe.

Als Positivkontrollen dienten DNA-Aufreinigungen von *R. monacensis*, *R. rickettsii* (Dr. Kathrin Hartelt, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg) und *R. conorii* (Dr. Gerhard Dobler, Mikrobiologisches Institut der Bundeswehr, München).

Primersequenzen

PanRick_2_for: 5'-ATAGGACAACCGTTTATTT-3'

PanRick_2_rev: 5'-CAAACATCATATGCAGAAA-3'

TaqMan-Sonde

PanRick_3_taq: 5'-FAM-CCTGATAATTCGTTAGATTTTACCG-TMR-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 20µl-Reaktionsansatz enthielt folgende Reagenzien:

- 2µl LightCycler DNA Mastermix (Roche)
- 1,6mM MgCl₂
- je 0,5µM der Primer PanRick_2_for und PanRick_2_rev
- 0,2µM TaqMan-Sonde PanRick_3_taq
- 5µl aufgereinigte DNA

Temperaturprofil der realtime-PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Kühlung
94°C	94°C	55°C	40°C
1min	4s	45s	30s
	55 Zyklen		

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte jeweils am Ende der Annealing-Phase im Kanal F1 (530nm).

2.4.2.1.2 Blockcycler-PCR des rOmpA-Gens

Da anhand der realtime-PCR des *gltA*-Gens keine Unterscheidung der Rickettsien-Arten möglich war, wurde für alle positiven Proben eine zusätzliche PCR auf dem Blockcycler durchgeführt, die spezifisch für Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe ist. Das Amplifikat dieser PCR wurde für die anschließende DNA-Sequenzierung verwendet; da sich die Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe in diesem Abschnitt ausreichend voneinander unterscheiden, wird damit eine Artbestimmung ermöglicht. Zielsequenz der PCR ist ein 532bp langes Fragment des *rOmpA*-Gens, welches für ein Oberflächenprotein der Rickettsien codiert (rickettsial outer membrane protein). Die Primer wurden von Regnery et al. (1991) übernommen. Das Temperaturprofil und die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes wurden modifiziert, um die Spezifität der PCR zu erhöhen.

Als Positivkontrollen dienten wiederum DNA-Aufreinigungen von *R. monacensis*, *R. rickettsii* (Dr. Kathrin Hartelt, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg) und *R. conorii* (Dr. Gerhard Dobler, Mikrobiologisches Institut der Bundeswehr, München).

Primersequenzen

Rr190.70p: 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3'

Rr190.602n: 5'-AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 50µl-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10mM Tris-HCl (pH 8,3) und 50mM KCl
- 2mM MgCl₂
- 40,2mM Tris-HCl (pH 9)
- 200µM dNTPs
- je 0,5µM der Primer Rr190.70p und Rr190.602n
- 1,5 units AmpliTaq DNA-Polymerase
- 5µl aufgereinigte DNA

Temperaturprofil der PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95°C	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
3min	20s	30s	1min	5min	∞
	35 Zyklen				

2.4.2.1.3 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Die Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte, wie unter 2.4.1.1.3 beschrieben, mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

2.4.2.1.4 Blockcycler-PCR des gltA-Gens

Einige Proben, die in der realtime-PCR schwach positiv getestet wurden, konnten nicht erfolgreich mit der *rOmpA*-PCR amplifiziert werden. Um ein Amplifikat für die Artbestimmung mittels Sequenzierung zu erhalten, wurde für diese Proben daher eine weitere PCR auf dem Blockcycler verwendet, deren Zielsequenz ebenfalls auf dem *gltA*-Gen liegt.

Die Primer dieser PCR wurden von Nilsson et al. (1999a) übernommen, PCR-Ansatz und Temperaturprofil stammen von Hartelt (2004). Das Amplifikat dieser PCR hatte eine Größe von 341bp.

Primersequenzen

RH314: 5'-AAACAGGTTGCTCATCATTC-3'

RH654: 5'-AGAGCATTTTTTATTATTGG-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 50µl-Reaktionsansatz enthält folgendes Reaktionsgemisch:

- 10mM Tris-HCl (pH 8,3) und 50mM KCl
- 2,5mM MgCl₂
- 40,2mM Tris-HCl (pH 9)
- 200µM dNTPs
- je 0,5µM der Primer RH314 und RH654
- 1,5 units AmpliTaq DNA-Polymerase
- 5µl aufgereinigte DNA

Temperaturprofil

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95°C	95°C	54°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	45s	5min	∞
	35 Zyklen				

2.4.2.1.5 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Die Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte, wie unter 2.4.1.1.3 beschrieben, mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese.

2.4.2.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Systeme sind spezifisch für die Gattung *Rickettsia*, erlauben jedoch keine Identifizierung der Rickettsienarten. Daher wurden die Amplifikate der *rOmpA*-PCR bzw. für *rOmpA*-negative Proben die Amplifikate der *gltA*-Blockcycler-PCR sequenziert, um eine Artbestimmung zu ermöglichen.

2.4.2.2.1 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification Kits der Firma Qiagen.

Die PCR-Amplifikate wurden zunächst im Verhältnis 1:5 mit Bindepuffer (PB-Puffer) verdünnt und auf die Säule gegeben. Die Säulen wurden anschließend bei 16000g für 1min zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen und 750µl Waschpuffer (PE-Puffer) zugegeben. Um die Verunreinigungen möglichst komplett zu entfernen, folgten zwei Zentrifugationsschritte bei 16000g für 1min, nach denen jeweils der Durchfluss verworfen wurde. Da der PE-Puffer Ethanol enthält, das die Sequenzierreaktion hemmen würde, wurden die Säulen vor der Elution für 10min bei 56°C im Ofen getrocknet, um sämtliche Alkoholreste zu entfernen. Zur Elution der DNA wurden 100µl Elutionspuffer auf die Säulen gegeben und wiederum für 1min bei 16000g zentrifugiert. Das Eluat wurde direkt in die Sequenzierreaktion eingesetzt oder bis zur Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.4.2.2.2 Cycle Sequencing

Für das Cycle Sequencing wurde das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet, das neben Magnesiumchlorid, Puffer und dNTPs die fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotide („BigDye-Terminatoren“) sowie das Stoffelfragment der AmpliTaq-DNA-Polymerase enthält. Das Cycle Sequencing wurde in einem Blockcycler (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) durchgeführt.

Die *rOmpA*-Amplifikate wurden zunächst sowohl ausgehend vom forward-Primer Rr190.70p als auch vom reverse-Primer Rr190.602n sequenziert. Da sich die Sequenzier-Ergebnisse für die beiden Ansätze nicht unterschieden, wurde im weiteren Verlauf ausschließlich mit dem forward-Primer gearbeitet. Für die *gltA*-

Primer wurde nur der forward-Primer verwendet, da sich dieser in früheren Versuchen als besser geeignet erwies (Hartelt, 2004).

verwendete Primer

rOmpA-Amplifikate: Rr190.70p oder Rr190.602n

gltA-Amplifikate: RH314

Reaktionsansatz

Der 20µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,5x BigDye Terminator v1.1
- 0,5x BigDye Sequencing Buffer
- 0,5µM Primer
- 2µl aufgereinigtes Amplifikationsprodukt

Temperaturprofil

Denaturierung	Annealing (<i>rOmpA/gltA</i>)	Elongation	Kühlung
96°C	55°C/54°C	60°C	4°C
10s	10s	4min	∞
25 Zyklen			

2.4.2.2.3 *Aufreinigung der Sequenzierprodukte*

Im Anschluss an das Cycle Sequencing wurden die Proben mit 2µl 2,2%igem SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) versetzt, 3 Minuten bei 94°C im Blockcycler denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um aneinandergelagerte ddNTPs zu trennen.

Für die anschließende Aufreinigung der Sequenzierprodukte wurde das DyeEx 2.0 Spin Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Säulen wurden zunächst gut gemischt, um das Gel zu resuspendieren, und anschließend für 4 Minuten bei 500g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, das Sequenzierprodukt in die Mitte des Gels gegeben und nochmals für 4 Minuten bei 500g zentrifugiert. Das Eluat enthält das aufgereinigte Sequenzierprodukt.

2.4.2.2.4 Kapillargelelektrophorese

Für die Kapillargelelektrophorese wurde ein ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) verwendet. Nach Herstellerangaben wurden 4µl des Eluats in einem Sequenzier tube mit 20µl HiDi-Formamid, das der Stabilisierung der Probe dient, versetzt, für 5s bei 500g zentrifugiert und in das Gerät eingesetzt.

2.4.2.2.5 Datenbank-Recherche

Alle erhaltenen DNA-Sequenzen wurden zunächst von Hand nachgelesen, um Basenzuordnungs-Fehler durch die Sequenziersoftware auszuschließen. Die korrigierten Sequenzen wurden ins FASTA-Format umgewandelt und mit Hilfe des frei zugänglichen Programms BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit Sequenzen in der Gendatenbank GenBank (NCBI) verglichen.

2.4.2.3 Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern

2.4.2.3.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für den Nachweis von Rickettsien-Antikörpern mittels ELISA wurden mit *R. conorii* beschichtete ELISA-Mikrotiterplatten der Firma Biotrin/Vircell verwendet. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion kam, ebenso wie bei dem unter 2.4.1.2.2 beschriebenen Coxiellen-ELISA, ein all species-Konjugat (Protein G-Peroxidase) der Firma Progen zum Einsatz. Da kein Serum eines Rickettsien-infizierten Nagers zur Verfügung stand, diente ein positiv getestetes Hundeserum (zur Verfügung gestellt von Dr. Torsten Naucke, Labor ParasitusEx e.V., Niederkassel) als Positivkontrolle. Die Durchführung des ELISA wurde im Vergleich zu den jeweiligen Herstellerangaben modifiziert.

Testdurchführung

- Positivkontrolle 1:20 mit Verdünnungspuffer verdünnen; Nagerseren und -transsudate werden unverdünnt eingesetzt
- jeweils 100µl Probe bzw. Kontrolle pro Vertiefung zugeben
- 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 200µl Waschpuffer (Progen) waschen

- Konjugat 1:100 mit Waschpuffer verdünnen
- jeweils 200µl Konjugatverdünnung pro Vertiefung zugeben
- 60 min bei Raumtemperatur inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 200µl Waschpuffer waschen
- jeweils 200µl TMB-Substrat (KPL, gebrauchsfertige Lösung) pro Vertiefung zugeben
- 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- jeweils 50µl Stopplösung (KPL) pro Vertiefung zugeben und kurz schütteln
- Ablesen der Platten mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450nm

2.4.2.3.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Da sich der Rickettsien-ELISA für die Untersuchung der Nagerseren als ungeeignet erwies, wurde stattdessen ein indirekter Immunfluoreszenztest durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis von Rickettsien-Antikörpern in Nagerseren und -transsudaten Objektträger der Firma Fuller Labs verwendet, die mit *R. conorii*-infizierten Vero-Zellen beschichtet waren. Stichprobenartig wurden einige Proben zusätzlich mit Objektträgern getestet, die mit *R. helvetica*-infizierten Vero-Zellen beschichtet waren (Mikrobiologisches Institut der Bundeswehr, München). Als sekundärer Antikörper wurde ein FITC-markierter Anti-Maus-Antikörper der Firma DAKO verwendet. Das Serum einer positiv auf *Rickettsia* spp.-Antikörper getesteten Gelbhalsmaus diente als Positivkontrolle, PBS als Negativkontrolle. Sowohl die *R. helvetica*-Objektträger als auch die Positivkontrolle wurden von Dr. Sandra Essbauer (Mikrobiologisches Institut der Bundeswehr, München) zur Verfügung gestellt.

Testdurchführung

- Nagerseren und Positivkontrolle 1:20 in PBS verdünnen; Nagertranssudate werden unverdünnt eingesetzt
- pro Auftragsstelle 10µl Probe bzw. Kontrolle auftragen und mit der Pipettenspitze vorsichtig verteilen
- Objektträger 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- Objektträger vorsichtig mit PBS abspülen und 5 min in PBS-Kammer waschen, dabei schwenken
- Konjugat 1:20 mit PBS verdünnen; 1 Tropfen Evans Blue zugeben, sodass die Flüssigkeit hell blau erscheint

- Objektträger zwischen den Auftragsstelle mit Wattestäbchen oder Filterpapier trocknen
- pro Auftragsstelle 10µl Konjugatverdünnung auftragen
- Objektträger 30 min bei 37°C in feuchter Kammer inkubieren
- Objektträger vorsichtig mit PBS abspülen und 5 min in PBS-Kammer waschen, dabei schwenken
- Objektträger zwischen den Auftragsstellen trocknen
- Objektträger mit mounting medium überschichten und Deckglas möglichst luftblasenfrei auflegen
- Auswertung der Proben am Fluoreszenzmikroskop

2.4.3 FSME-Viren

Zur Bestimmung der Prävalenz von FSME-Viren wurden *I. ricinus* aus Endemiegebieten Süddeutschlands molekularbiologisch untersucht. Die detektierten FSME-Viren wurden durch Sequenzierung charakterisiert und phylogenetisch eingeordnet.

2.4.3.1 Homogenisieren der Zecken

Vor der Extraktion der Nukleinsäuren wurden die Zecken homogenisiert, da mit der verwendeten Aufreinigungsmethode nur flüssige Probenmaterialien verarbeitet werden können. Die Homogenisierung erfolgte in 400µl Zellkulturmedium (MEM-Earle (1x) 2,2g/l NaHCO₃ und 0,1% Gentamycin); dies ermöglichte das Überleben der Viren und somit eine spätere Anzucht in der Zellkultur.

Da die FSME-Virus-Prävalenz bei Zecken in Baden-Württemberg erfahrungsgemäß sehr niedrig ist (zwischen 0 und 3,4%), können die Zecken für die molekularbiologische Untersuchung in Pools zusammengefasst werden.

Die Aufarbeitung der Zecken erfolgte im Rahmen zweier Diplomarbeiten (Jahn, 2009 und Wessel, 2010); daher kamen unterschiedliche Methoden zum Einsatz (Tab. 10). Für die spätere Anzucht der FSME-Viren in der Zellkultur sind Homogenate einzelner Zecken besser geeignet als solche aus Zeckenpools, da die Menge an Verunreinigungen (Proteine etc.) mit zunehmender Zeckenzahl im Pool steigt. Aus diesem Grund wurde für die Zecken aus den Gebieten Bodanrück, Hagnau, Hödinger Tobel und Oberprechtal die Homogenisierung einzelner Zecken gewählt.

Homogenisierung mittels Impfösen

Da aus Gengenbach nur eine kleine Zahl an Zecken zur Verfügung stand, wurden diese einzeln aufgearbeitet und untersucht.

Die Tiere wurden einzeln mit Hilfe von Kunststoff-Impfösen in 400µl Zellkulturmedium zerkleinert. Die Homogenate wurden für 5 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert; für die Nukleinsäure-Extraktion wurden 200µl des Überstands verwendet. Diese Zecken wurden einzeln auf FSME-Viren untersucht.

Homogenisierung mittels Kugelmühle

Die Zecken aus allen anderen Untersuchungsgebieten wurden mit Hilfe einer Kugelmühle (Retsch MM 400) homogenisiert. Hierzu wurden Einzelzecken oder Pools aus je fünf Adulten bzw. zehn Nymphen in 2ml-Eppendorfgefäße überführt, mit je 400µl Zellkulturmedium und 3 Stahlkugeln versetzt und für 10 Minuten bei 30 Hz zerkleinert.

Homogenate aus **Zeckenpools** wurden anschließend für 5 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert; für die Nukleinsäure-Extraktion wurden 200µl des Überstands verwendet.

Homogenate aus **Einzelzecken** wurden vor der Nukleinsäure-Extraktion gepoolt. Nach Zentrifugation der Einzel-Homogenate für 5 Minuten bei 3000 g und 4°C wurden jeweils 100µl der Überstände zu Pools aus fünf Adulten bzw. zehn Nymphen zusammengeführt und jeweils 950µl (Nymphen) bzw. 500µl (Adulte) eines Pools für die Nukleinsäureextraktion eingesetzt. Im Falle von FSME-Virus-positiven Pools wurden im Anschluss an die FSME-Virus-spezifische PCR zusätzlich die Nukleinsäuren der Einzel-Homogenate extrahiert und untersucht, um so die exakte Zahl der mit FSME-Viren infizierten Zecken ermitteln zu können.

Tab. 10: Überblick über die verwendeten Homogenisierungs- und Aufreinigungsarten von *Ixodes ricinus* aus den einzelnen Untersuchungsgebieten.

Untersuchungsgebiet	Homogenisierung	Nukleinsäure-Extraktion
Gengenbach	Impföse, einzeln	Einzel-Homogenate
Botnang	Kugelmühle, gepoolt	Pool-Homogenate
Großbottwar	Kugelmühle, gepoolt	Pool-Homogenate
Hausach	Kugelmühle, gepoolt	Pool-Homogenate
Pulverdinger Holz	Kugelmühle, gepoolt	Pool-Homogenate
Bodanrück	Kugelmühle, einzeln	gepoolte Einzel-Homogenate
Hagnau	Kugelmühle, einzeln	gepoolte Einzel-Homogenate
Hödinger Tobel	Kugelmühle, einzeln	gepoolte Einzel-Homogenate
Oberprechtal	Kugelmühle, einzeln	gepoolte Einzel-Homogenate

2.4.3.2 Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren

2.4.3.2.1 Nukleinsäure-Extraktion

Für die Extraktion von Nukleinsäuren aus *I. ricinus* wurde eine automatische Aufreinigung mittels NucliSens®easyMAG™ (Biomerieux) durchgeführt.

Aufreinigungsprotokoll

- Je nach Homogenisierungsart Einsatz von 200µl (Einzel-Homogenate, Pool-Homogenate), 500µl (gepoolte Einzel-Homogenate von Adulten) oder 950µl (gepoolte Einzel-Homogenate von Nymphen) Probenüberstand
- Zugabe von 100µl Silika-Suspension pro Probe im Anschluss an die geräteinterne Lyse der Proben
- Elution der DNA mit 55µl Elutionspuffer
- Zugabe von 1µl RNasin pro Probe zum Schutz vor RNasen

2.4.3.2.2 FSME-Virus-spezifische TaqMan realtime-PCR

Zum Nachweis von FSME-Viren in *I. ricinus* wurde eine FSME-Virus-spezifische realtime-PCR verwendet, mit der ein 68bp großes Fragment der 3'-nichtkodierenden Region des FSME-Virus-Genoms amplifiziert wird. Primer, TaqMan-Sonde und Temperaturprofil wurden von Schwaiger und Cassinotti (2003) übernommen. Die PCR wurde mit Hilfe des LightCycler 1.5 (Roche) durchgeführt.

Da es sich beim FSME-Virus um ein RNA-Virus handelt, muss vor der eigentlichen PCR eine reverse Transkription durchgeführt werden, bei der die RNA des Virus in cDNA umgeschrieben wird. Die eingesetzte Tth-Polymerase (LightCycler RNA Master Hyb Probe, Roche) besitzt sowohl reverse Transkriptase- als auch Polymerase-Aktivität, sodass beide Reaktionen in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden können.

Als Positivkontrolle wurden Nukleinsäure-Aufreinigungen von Zellkulturüberständen des FSME-Virus-Stamms Hypr eingesetzt.

Primersequenzen

F-TBE 1: 5'-GGGCGGTTCTTGTCTCC-3'

R-TBE 2: 5'-ACACATCACCTCCTTGTCAGACT-3'

TaqMan-Sonde

TBE-Probe-WT 5'-FAM-TGAGCCACCATCACCCAGACACA-TAMRA-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 20µl-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 3,2µl H₂O
- 3,25mM Mn
- je 0,25µM der Primer F-TBE 1 und R-TBE 2
- 0,2µM TaqMan-Sonde TBE-Probe-WT
- 7,5µl Enzym-Mix (enthält Tth-Polymerase, PCR-Puffer und dNTPs)
- 5µl Probe

Temperaturprofil

reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Kühlung
60°C	95°C	95°C	60°C	40°C
20 min	2min	5s	15s	30s
		50 Zyklen		

2.4.3.3 Anzucht der FSME-Viren

Um ausreichend Material für die spätere molekularbiologische Charakterisierung der FSME-Viren aus den Zecken zu gewinnen, erfolgte zunächst eine Vermehrung der Viren der in der PCR positiven Zeckenhomogenate auf PS-Zellen (porcine stable kidney cell line = Schweinenierenzellen). Die Methode wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Wessel (2010) etabliert.

Da es sich beim FSME-Virus um einen Erreger der Sicherheitsstufe 3 handelt, wurden sämtliche Zellkultur-Arbeiten im L3-Labor des Landesgesundheitsamts Baden-Württemberg durchgeführt.

Die PS-Zellen wurden zunächst unter Standardbedingungen (37°C, 0,5% CO₂-Gehalt) mit Wachstumsmedium (MEM-Earle (1x) 2,2g/l NaHCO₃ mit 0,1% Streptomycin, Penizillin oder Gentamycin; 10% fötales Kälberserum (FKS)) in Zellkulturflaschen kultiviert, um die für die Infektion benötigten Zellmonolayer zu erhalten (Lindl, 2002). Die Überprüfung der Zelldichte erfolgte täglich mikroskopisch.

Sobald ein dichter Zellrasen sichtbar war, wurde das Zellkulturmedium vollständig abgesaugt. Für die Infektion der Zellen wurden jeweils 200µl der FSME-Virus-positiven Zecken-Homogenate und 300µl Erhaltungsmedium (MEM-Earle (1x) 2,2g/l NaHCO₃, 0,1% Antibiotika, 2% FKS) gemischt und durch leichtes Schwenken gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten wurden die Zellen mit 5ml Erhaltungsmedium überschichtet und unter Standardbedingungen für mehrere Tage inkubiert. Die Kontrolle des zytopathischen Effekts (= CPE), der durch das Abrunden und Ablösen infizierter Zellen sichtbar wird, erfolgte wiederum täglich mikroskopisch. Sobald ein vollständiger CPE zu beobachten war, wurden die FSME-Viren geerntet, indem das Zellkulturmedium, das die abgelösten Zellen sowie die freigesetzten FSME-Viren enthält, in 15ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch zehnmündige Zentrifugation bei 4000g pelletiert wurden. Der FSME-Virus-haltige Überstand wurde abgenommen und in Aliquots von je 1ml aufgeteilt, die entweder sofort weiter bearbeitet oder bei -80°C eingefroren wurden.

Zur weiteren Vermehrung der Viren erfolgten zusätzliche Zellkulturpassagen, indem Aliquots sterilfiltriert und PS-Zellen mit 500µl des Filtrats nach obigem Protokoll infiziert wurden.

Als Negativkontrollen dienten nichtinfizierte Zellen sowie Zellkulturen, die mit FSME-Virus-negativen Zeckenhomogenaten behandelt wurden.

Für die molekularbiologische Charakterisierung der FSME-Virus-Isolate wurden jeweils 200µl eines Aliquots in 2ml Lysepuffer überführt und die Nukleinsäuren nach externer Lyse mit Hilfe des NucliSens®easyMAG™ extrahiert. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.4.3.2.1 beschrieben. Die Nukleinsäure-Aufreinigungen wurden anschließend für die PCR des E-Gens und des NS2a-Gens verwendet.

2.4.3.3.1 Ermitteln der Viruskonzentration

Zur Überprüfung der Virusvermehrung diente die unter 2.4.3.2.2 beschriebene FSME-Virus-spezifische realtime-PCR mit gleichzeitiger Quantifizierung. Um die FSME-Virus-Titer in den Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurden diese gemeinsam mit Proben mit bekannter Viruskonzentration in der realtime-PCR analysiert. Anhand der Ct-Werte der Proben mit bekannter Viruskonzentration konnte eine Standardkurve berechnet werden; die Viruskonzentrationen der

Zellkulturüberstände wurden durch den Vergleich der jeweiligen Ct-Werte mit dieser Standardkurve ermittelt. Die Viruskonzentration wird in TCID₅₀/ml angegeben: eine TCID₅₀ (TCID = tissue culture infectious dose) entspricht der Virusmenge, bei der 50% der beimpften Zellen einen CPE zeigen.

Für die Erstellung der Standardkurve wurde Zellkulturüberstand einer FSME-Virus-Zellkultur des Stamms Hypr verwendet, der eine Viruskonzentration von 10⁹ TCID₅₀/ml aufwies. Von einer 1:10-Verdünnungsreihe dieser Probe (10⁹-10⁴ TCID₅₀/ml) wurden die Nukleinsäuren, wie unter 2.4.3.2.1 beschrieben, mit Hilfe des NucliSens®easyMAG™ aufgereinigt (200µl Probeneinsatz, 55µl Elution). Diese wurden anschließend gemeinsam mit den zu quantifizierenden Proben in die realtime-PCR eingesetzt.

2.4.3.4 Charakterisierung der FSME-Viren

Für die molekularbiologische Charakterisierung der FSME-Virus-Isolate wurden sowohl das E-Gen als auch das NS2a-Gen mittels zweier FSME-Virus-spezifischer Blockcycler-PCRs amplifiziert und anschließend sequenziert.

2.4.3.4.1 Blockcycler-PCR des E- und NS2a-Gens

Die Primer für die Amplifikation des E-Gens wurden von Kupca et al. (2010) übernommen. Zielsequenz dieser PCR ist ein 1687bp großes Fragment des FSME-Virus-Genoms, das das 1488bp große E-Gen und angrenzende Bereiche umfasst. Die Primer der NS2a-Gen-PCR wurden von Dr. Sandra Essbauer (Mikrobiologisches Institut der Bundeswehr, München) entwickelt. Sie schließen ein 1190bp großes DNA-Fragment ein, das das 690bp große NS2a-Gen und angrenzende Bereiche enthält.

Das für die E-Gen- und die NS2a-Gen-PCR identische Temperaturprofil wurde von Kupca et al. (2010) übernommen.

Sowohl für die E-Gen- als auch für die NS2a-Gen-PCR wurde das SuperScript III One-Step PCR Kit (Invitrogen) verwendet, das neben einer reversen Transkriptase auch eine DNA-Polymerase enthält; auf diese Weise konnten die Umschreibung der RNA in cDNA sowie die PCR in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden.

Primer E-Gen-PCR

TBE-885: 5'-GGTTACCGTTGTGTGGTTGACC-3'

TBE-c2571a: 5'-CTCCGGGTAGTAGGCATAATTG-3'

TBE-c2571b: 5'-CTCCGGGTAGTATGCATAATTG-3'

Die beiden reverse-Primer TBE-c2571a und TBE-c2571b wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und eingesetzt.

Primer NS2a-Gen-PCR

TBew-3412: 5'-ACAATGCCACCAGTGACGTTC-3'

TBew-c4601: 5'-GACCTTCGGGATGACCTCAG-3'

Reaktionsansatz

Die 50µl-Ansätze beider PCR-Methoden setzten sich wie folgt zusammen:

- 25µl Mix (enthält 0,4mM dNTPs, 3,2mM MgSO₄)
- je 0,2µM Primer: TBE-885 und TBE-c2571 für E-Gen-PCR
TBew-3412 und TBew-c4601 für NS2a-Gen-PCR
- 14µl H₂O
- 2µl Enzym-Mix (enthält reverse Transkriptase und Taq-Polymerase)
- 5µl Probe

Temperaturprofil für E-Gen- und NS2a-Gen-PCR

reverse Transkription	Denat.	Denat.	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
50°C	94°C	94°C	54°C	68°C	68°C	4°C
45 min	5 min	30 s	30 s	2 min	10 min	30s
		40 Zyklen				

2.4.3.4.2 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Die Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.4.1.1.3). Aufgrund der Größe der Amplifikate wurden hierfür 1%ige Agarosegele (0,5g Agarose in 50ml TBE-Puffer) verwendet; die Laufzeit betrug 75-90 Minuten bei 80V.

2.4.3.4.3 Sequenzierung

Die Amplifikate der E-Gen- und der NS2a-Gen-PCR wurden sequenziert, um eine Identifizierung und Charakterisierung der aus *I. ricinus* isolierten FSME-Viren zu ermöglichen.

Aufreinigung der PCR-Produkte

Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte mit Hilfe des QiaQuick PCR Purification kits (Qiagen) wie unter 2.4.2.2.1 beschrieben.

Cycle Sequencing

Sowohl die E-Gen- als auch die NS2a-Gen-PCR lieferten mit 1687bp bzw. 1190bp sehr große Amplifikate; mit der verwendeten Sequenzier-Methode können jedoch höchstens 750-800bp pro Primer-Ansatz analysiert werden. Um jeweils die gesamte Sequenz zu erhalten, wurden daher die E-Gen- und NS2a-Gen-Amplifikate jeweils mit dem forward- und dem reverse-Primer sequenziert; für die Sequenzierung der E-Gen-Amplifikate wurden zudem zwei zusätzliche Sequenzierprimer eingesetzt. Die auf diese Weise erhaltenen Fragmente, die sich in Teilbereichen überschneiden, wurden im Anschluss an die Sequenzierung zu einer einzigen Sequenz pro Gen und Probe zusammengefügt.

verwendete Primer

NS2a-Gen-Amplifikate: TBEw-3412 oder TBEw-c4601

E-Gen-Amplifikate: TBE-885, TBE-c2571, TBE-c1648 oder TBE-Seq2

Sequenzen der zusätzlichen E-Gen-Primer

TBE-c1648: 5'-GCAGAGCCAGATCATTGAACC-3'

TBE-Seq2: 5'-GGTTCAATGATCTGGCTCTGC-3'

Reaktionsansatz

Jeder 20µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,5x BigDye Terminator v1.1
- 0,5x BigDye Sequencing Buffer
- 0,5µM Primer
- 10µl H₂O
- 2µl aufgereinigtes Amplifikationsprodukt

Temperaturprofil (identisch für E-Gen- und NS2a-Gen-Amplifikate)

Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlung
96°C	54°C	60°C	4°C
10s	10s	4min	∞
25 Zyklen			

Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Im Anschluss an das Cycle Sequencing wurden die Proben mit 2µl 2,2%igem SDS versetzt, 3 Minuten bei 94°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die anschließende Aufreinigung der Sequenzierprodukte erfolgte, wie unter 2.4.2.2.3 beschrieben, mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kits (Qiagen).

Kapillargelelektrophorese

Die Kapillargelelektrophorese zur Auftrennung der Sequenzierprodukte erfolgte mit Hilfe eines ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). In einem Sequenzier tube wurden 4µl des aufgereinigten Eluats mit 20µl HiDi-Formamid versetzt, 5s bei 500g zentrifugiert und in das Gerät eingesetzt.

Datenbankrecherche

Alle DNA-Sequenzen wurden zunächst von Hand nachgelesen und gegebenenfalls korrigiert. Die Teilsequenzen jeder Probe (je zwei für das NS2a-Gen und vier für das E-Gen) wurden anhand der überlappenden Bereiche zu einer einzigen Sequenz pro Probe und Gen zusammengefügt. Die auf diese Weise bearbeiteten Sequenzen wurden ins FASTA-Format übertragen und mit Hilfe des Programms BLAST mit Sequenzen der Gendatenbank GenBank (NCBI) verglichen.

2.4.3.5 Phylogenetische Analysen

Um die FSME-Viren aus Süddeutschland phylogenetisch einzuordnen, erfolgte die Erstellung von Stammbäumen anhand der E-Gen- und NS2a-Gen-Sequenzen. In die Stammbaumberechnungen wurden Sequenzen von 24 (E-Gen) bzw. 23 (NS2a-Gen) FSME-Virus-Stämmen einbezogen (siehe Anhang). Sequenzen der beiden Flaviviren Louping ill-Virus und OHF (Omsk Hämorrhagisches Fieber)-Virus wurden zudem als Vergleichssequenzen verwendet. Das OHF-Virus diente als Außengruppe, um

„gewurzelte“ Stammbäume zu erhalten. Mit Hilfe einer Außengruppe, d.h. einem Virus, das nahe mit dem FSME-Virus verwandt ist, erhalten Stammbäume eine Richtung bzw. Zeitachse. Die Länge der Kanten symbolisiert dabei die phylogenetische Entfernung der Sequenzen zueinander.

Mit Hilfe eines multiplen Sequenzalignments wurden zunächst alle verwendeten Sequenzen auf eine einheitliche Länge gekürzt. Für die anschließende Berechnung der Stammbäume wurden sowohl die Neighbour Joining- als auch die Maximum Parsimony-Methode verwendet. Diese beruhen auf unterschiedlichen Algorithmen, sodass sich die jeweils berechneten Stammbäume voneinander unterscheiden lassen.

Die Stammbaumberechnungen erfolgten sowohl anhand der Nukleotidsequenzen als auch anhand der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen.

Die Erstellung von multiplen Sequenzalignments sowie die Umwandlung von Nukleotid- in Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm BioEdit, Version 7.0.9.0 (Hall, 1999; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), durchgeführt. Die Baumberechnung mittels Neighbour Joining und Maximum Parsimony erfolgte mit dem Programm Phylip (Felsenstein, 1989; <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Für die grafische Darstellung der Stammbäume wurde das Programm FigTree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) verwendet.

Stammbaumberechnung mittels Neighbour Joining

Bei der Stammbaumberechnung mittels Neighbour Joining (= „Zusammenfügen nächster Nachbarn“) handelt es sich um ein distanzbasiertes Näherungsverfahren. Dabei wird zunächst eine Distanzmatrix erstellt, in der die Unterschiede, d.h. die Nukleotidsubstitutionen, zwischen jeweils zwei Sequenzen angegeben sind. Diese Matrix bildet die Grundlage für die Konstruktion der möglichen Stammbäume.

Da die Zahl der möglichen Bäume exponentiell mit der Zahl der einbezogenen Sequenzen wächst, ist es nicht möglich, jeden einzelnen Baum zu berechnen und zu bewerten; stattdessen kommen Näherungsverfahren zum Einsatz. Bei der Methode des Neighbour Joining werden ähnliche Sequenzpaare zu Gruppen zusammengefasst und in der weiteren Berechnung als eine einzige Sequenz behandelt, sodass sich die Zahl der Sequenzen mit jedem Gruppierungsschritt verringert. Mit Hilfe dieses Näherungsverfahrens lassen sich auch für eine sehr

große Zahl an Sequenzen sehr schnell Stammbäume berechnen (von Haeseler und Liebers, 2003).

Stammbaumerstellung mittels Maximum Parsimony

Bei der Stammbaumberechnung mittels Maximum Parsimony (= „größte Sparsamkeit“) wird derjenige Stammbaum als der optimale angesehen, bei dem die untersuchten Sequenzen mit der minimalen Anzahl von Substitutionen miteinander verbunden sind. Die Grundannahme hierbei ist, dass Substitutionen seltene Ereignisse sind, weshalb Mehrfachsubstitutionen einer Position unwahrscheinlich sind. Multiple oder Resubstitutionen werden daher nicht in die Berechnung eingeschlossen. Weiterhin wird vorausgesetzt, dass die einzelnen Nukleotidpositionen sich unabhängig voneinander entwickeln. Die Gesamtzahl der Substitutionen eines Stammbaums ist somit die Summe der Substitutionen an den einzelnen Positionen. Für die Berechnung des Stammbaums wird zunächst ein multiples Alignment der zu untersuchenden Sequenzen angefertigt. Für jede Spalte des Alignments, d.h. für jede Nukleotidposition, werden anschließend alle möglichen Bäume sowie die zugehörigen Substitutionswerte berechnet. Als optimaler Baum wird derjenige bezeichnet, bei dem die Summe der Substitutionswerte aller Spalten minimal ist. Je länger die verwendeten Sequenzen sind, desto unwahrscheinlicher ist es, dass mehrere Bäume denselben Gesamt-Substitutionswert aufweisen, d.h. desto eher kann ein einziger optimaler Baum erstellt werden. Um den Zeit- und Rechenaufwand bei der Stammbaumberechnung in annehmbarem Rahmen zu halten, werden auch bei dieser Methode, ebenso wie bei den distanzbasierten Verfahren, nicht alle möglichen Bäume einzeln berechnet, sondern mit Hilfe verschiedener Näherungsverfahren ermittelt (von Haeseler und Liebers, 2003).

Berechnung von Bootstrap-Werten

Mit Hilfe der Berechnung von Bootstrap-Werten wird die Zuverlässigkeit des berechneten Stammbaums wiedergegeben. Dabei werden aus dem ursprünglichen Alignment multiple Datensätze („Pseudoalignments“) generiert, anschließend werden für jeden Datensatz Stammbäume gemäß der verwendeten Methode berechnet. Im ermittelten Stammbaum (z.B. im Falle von Maximum Parsimony der „most parsimonious tree“) wird abschließend überprüft, wie oft ein einzelner Knotenpunkt mit den dazugehörigen Gruppierungen in den Stammbäumen des multiplen

Datensatzes auftaucht. Ist eine Gruppierung in jedem möglichen Baum vorhanden, so liegt ihr bootstrap-Wert bei 100%. Bootstrap-Werte über 90% zeigen eine sehr gute Unterstützung einer Verzweigung an, d.h. die Baumtopologie spiegelt mit großer Wahrscheinlichkeit die wahren phylogenetischen Verhältnisse wider. Gruppierungen mit Werten unter 70 werden hingegen durch die Daten nicht sehr gut gestützt (von Haeseler und Liebers, 2003).

Für die Berechnung der Bootstrap-Werte wurden in der vorliegenden Arbeit 100 multiple Datensätze verwendet.

2.4.4 Hantaviren

Um die Prävalenz von Hantaviren des humanpathogenen Typs Puumala in Nagern auf der Schwäbischen Alb zu ermitteln, wurde Lungengewebe von Nagern molekularbiologisch mittels PCR auf Puumala-Viren untersucht. Zudem wurden Blutproben der Nager serologisch auf Antikörper gegen Hantaviren getestet.

Weiterhin sollte überprüft werden, inwieweit sich bei humanen Puumala-Infektionen die Viren molekularbiologisch im Serum nachweisen lassen. Hierzu wurden Seren mittels PCR getestet, die von Patienten mit Verdacht auf Puumala-Virus-Infektionen stammten und im Jahr 2007 im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg serologisch untersucht worden waren.

2.4.4.1 Molekularbiologischer Nachweis von Puumala-Viren in Nagern und Humanseren

2.4.4.1.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nager

Für den molekularbiologischen Nachweis von Hantaviren des Typs Puumala im Lungengewebe von Nagern wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe des MaxwellTM 16 (Promega) isoliert. Hierfür wurden Gewebeproben von ca. 5x5mm Größe präpariert und in die Lysekammer des Maxwell überführt. Die Elution erfolgte mit 200µl Elutionspuffer. Da es sich bei Hantaviren um RNA-Viren handelt, wurde dem Eluat 1µl RNasin zugegeben, um eventuell vorhandene RNasen zu hemmen.

Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C aufbewahrt.

Humanseren

Die Nukleinsäureextraktion aus Humanseren erfolgte mit Hilfe des NucliSens[®]easyMAGTM. Es wurden jeweils 200µl Serum zur Extraktion eingesetzt, die Elution erfolgte mit 55µl Elutionspuffer. Zum Schutz vor RNasen wurde dem Eluat jeweils 1µl RNasin zugegeben.

Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C eingefroren.

2.4.4.1.2 PCR des S-Segments

Für die molekularbiologische Untersuchung von Nagerorganen und Humansenen auf Hantaviren wurde eine Puumala-spezifische nested-PCR des S-Segments mit vorhergehender reversen Transkription auf einem Blockcycler durchgeführt. Die Primer wurden von Essbauer et al. (2006) übernommen, die Temperaturprofile wurden modifiziert. Das Amplifikationsprodukt der ersten PCR wies eine Länge von 760bp auf, das der nested-PCR von 331bp.

Reverse Transkription und erste PCR wurden mit Hilfe des Qiagen One Step RT-PCR Kits durchgeführt. Dieses enthält sowohl eine reverse Transkriptase als auch eine DNA-Polymerase, sodass Umschreibung und PCR in einem einzigen Ansatz durchgeführt werden konnten.

Als Positivkontrolle dienten Lungengewebebeobproben von Rötelmäusen, die zuvor positiv auf Puumala-Viren getestet wurden (Kimmig et al., 2001b).

Primersequenzen der ersten PCR

PU342f: 5'-TATGGTAATGTCCTTGATGT-3'

PU1102r: 5'-GCCATDATDGTRTTYCTCAT-3'

Primersequenzen der nested-PCR

PU390f: 5'-GGNCARACAGCRGATTGGT-3'

PU721r: 5'-ACHCCCATNACWGGRCYAT-3'

Reaktionsansatz der reversen Transkription und ersten PCR

Reverse Transkription und erste PCR wurden in einem 50µl-Ansatz durchgeführt, der sich wie folgt zusammensetzte:

- 1x Puffer (enthält 2,5mM MgCl₂, KCl, Tris-Cl, (NH₄)₂SO₄)
- je 400µM dNTPs
- je 0,5µM der Primer PU342f und PU1102r
- 0,78U RNase Inhibitor (Qiagen OneStep RT-PCR Kit)
- 2µl RT-PCR-Mix (enthält reverse Transkriptase und HotStart DNA-Polymerase)
- 5µl Probe

Temperaturprofil der reversen Transkription und ersten PCR

reverse Transkription	Denat.	Denat.	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
45°C	95°C	94°C	46°C	72°C	72°C	4°C
30 min	15 min	30 s	30 s	75s	10 min	∞
		45 Zyklen				

Reaktionsansatz der nested-PCR

Der 50µl-Reaktionsansatz der nested-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

- 10mM Tris (pH 8,3), 50mM KCl
- 1,5mM MgCl₂
- je 200µM dNTPs
- 40,2mM Tris-Cl (pH 9)
- je 0,5µM der Primer PU390f und PU721r
- 1,5 units AmpliTaq DNA-Polymerase
- 1µl Amplifikationsprodukt der ersten PCR

Temperaturprofil der nested-PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95°C	95°C	47°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	30s	10min	∞
	35 Zyklen				

2.4.4.1.3 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Die Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgte, wie unter 2.4.1.1.3 beschrieben, mittels gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel.

2.4.4.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur genaueren Charakterisierung der in Nagern und Humanseren detektierten Puumala-Viren wurden die Amplifikationsprodukte der S-Segment-PCR sequenziert. Hierfür wurden die Amplifikate der ersten PCR verwendet, um möglichst lange Sequenzen zu erhalten. Für Proben, die erst in der nested-PCR positive Ergebnisse zeigten, wurde das kürzere nested-PCR-Amplifikationsprodukt sequenziert. Die Proben wurden sowohl mit dem forward- als auch mit dem reverse-Primer sequenziert; die daraus resultierenden Sequenzen wurden zusammengefügt.

Die einzelnen Schritte der Sequenzierung (Aufreinigung der Amplifikationsprodukte, Cycle Sequencing, Aufreinigung der Sequenzierprodukte, Kapillargelelektrophorese, Datenbankrecherche) wurden wie unter 2.4.2.2 beschrieben durchgeführt.

für das Cycle Sequencing verwendete Primer

Amplifikate der ersten PCR: PU342 oder PU1102r

Amplifikate der nested-PCR: PU390f oder PU721r

Reaktionsansatz des Cycle Sequencing

Der 20µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 0,5x BigDye Terminator v1.1
- 0,5x BigDye Sequencing Buffer
- 0,5µM Primer
- 2µl aufgereinigtes Amplifikationsprodukt

Temperaturprofil des Cycle Sequencing

Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlung
96°C	46°C	60°C	4°C
10s	10s	4min	∞
25 Zyklen			

Mit Hilfe des Programms BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>, Version 7.0.9.0) wurden aus den Nukleotid- die zugehörigen Aminosäuresequenzen berechnet, um weitere Vergleiche durchführen zu können.

2.4.4.3 Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren in Nagern

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der Lungengewebeproben wurden die Transsudate der Nager serologisch mittels ELISA untersucht. Alle Nager und Insectivora wurden auf Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe getestet, alle *Apodemus* spp. zusätzlich auf Antikörper gegen Vertreter der Hantaan-Gruppe. Die Untersuchungen wurden am Friedrich-Löffler-Institut in Greifswald/Insel Riems von Frau Dörte Kaufmann und Dr. Rainer Ulrich vorgenommen.

Der für die Puumala-Gruppe spezifische ELISA wurde aus Essbauer et al. (2006) übernommen; als Antigen diente in Hefezellen exprimiertes rekombinantes Nukleokapsid-Protein des Puumala-Stamms Vranica. Der für die Hantaan-Gruppe spezifische ELISA wurde nach Schlegel et al. (2009) durchgeführt; hier wurde in Hefe exprimiertes Nukleokapsid-Protein des Dobrava-Stamms Slovenia als Antigen verwendet. Als Positivkontrollen dienten Blutproben von zuvor positiv auf Puumala- bzw. Dobrava-Antikörper getesteten Rötelmäusen bzw. *Apodemus* spp. Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion wurde ein Peroxidase-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet.

Testdurchführung

- Transsudate 1:10 mit Verdünnungspuffer (PBS-Tween 0,05% mit 0,5% FKS) verdünnen
- jeweils 100µl Probe bzw. Kontrolle pro Vertiefung zugeben
- 60min bei 37°C inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 250µl Waschpuffer (PBS-Tween 0,1%, pH7,2) waschen
- Konjugat 1:3000 mit Verdünnungspuffer verdünnen
- jeweils 100µl Konjugatverdünnung pro Vertiefung zugeben
- 60min bei 37°C inkubieren
- im Waschgerät dreimal mit je 250µl Waschpuffer waschen
- jeweils 100µl TMB-Substrat (Bio-Rad) pro Vertiefung zugeben
- 10min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- jeweils 100µl Stopplösung (H₂SO₄) pro Vertiefung zugeben
- Ablesen der Platten mit Hilfe eines ELISA-Readers bei 450nm

2.5 NACHWEIS DER VEKTOREN-DNA

Um auszuschließen, dass negative Ergebnisse in der PCR auf ein fehlerhaftes Extrahieren der Nukleinsäuren zurückzuführen ist, wurde stichprobenartig die DNA der Vektoren (Zecken bzw. Nager) mit Hilfe spezifischer PCR-Reaktionen nachgewiesen. Auf diese Weise konnte der Erfolg der Nukleinsäureextraktion belegt und falsch-negative Ergebnisse ausgeschlossen werden.

2.5.1 Nachweis von Zecken-DNA mittels PCR

Die hier verwendete PCR zum Nachweis der Zecken-DNA erfasst sämtliche Arten der Schildzecken und konnte somit sowohl für *Dermacentor* spp. als auch für *Ixodes ricinus* verwendet werden. Zielsequenz dieser PCR ist ein 220bp großes Fragment der 18S rDNA.

Primer, Temperaturprofil und Reaktionsansatz wurden von Hartelt (2004) übernommen; zur Amplifikation wurde ein Blockcycler verwendet.

Primersequenzen

Zeck 18S for: 5'-AGATCGTTTCTTCCTACTTGGA-3'

Zeck 18S rev: 5'-ACCTACCATCGACAGTTGATA-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 50µl-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

- 10mM Tris-HCl (pH 8,3) und 50mM KCl
- 2,5mM MgCl₂
- 40,2mM Tris-HCl (pH 9)
- je 200µM dNTPs
- je 0,5µM der Primer Zeck 18S for und Zeck 18S rev
- 1,5 units AmpliTaq DNA-Polymerase
- 5µl aufgereinigte DNA

Temperaturprofil

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
94°C	94°C	49°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	30s	5min	∞
	40 Zyklen				

2.5.2 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte fand durch Agarose-Gelelektrophorese statt (siehe 2.4.1.1.3).

2.5.3 Nachweis von Nager-DNA mittels PCR

Die Primer der zum Nachweis von Nager-DNA durchgeführten PCR erfassten ein 248bp langes Teilstück des 18S rDNA-Gens sowohl von Wühlmausartigen (*Arvicolidae*) als auch von Echten Mäusen (*Muridae*). Die PCR konnte daher für alle in dieser Arbeit untersuchten Nagerarten verwendet werden.

Primer und Temperaturprofil wurden aus der Diplomarbeit von Schaaf (2005) übernommen; die PCR wurde auf einem Blockcycler durchgeführt.

Primersequenzen

Maus for: 5'-AGTACGCACGGCCGGTACAG-3'

Maus rev: 5'-ATGGGTCGTGCGCCGCCACGG-3'

Reaktionsansatz

Der Standard-Mix für jeden 50µl-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 10mM Tris-HCl (pH 8,3) und 50mM KCl
- 2,5mM MgCl₂
- 40,2mM Tris-HCl (pH 9)
- je 200µM dNTPs
- je 0,5µM der Primer Maus for und Maus rev
- 1,5 units AmpliTaq DNA-Polymerase
- 5µl aufgereinigte DNA

Temperaturprofil

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
94°C	94°C	49°C	72°C	72°C	4°C
3min	30s	30s	30s	5min	∞
	35 Zyklen				

2.5.4 Detektion der PCR-Produkte durch gelelektrophoretische Auftrennung

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte fand mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese statt (siehe 2.4.1.1.3).

2.6 VERWENDETE REAGENZIEN UND GERÄTE

2.6.1 Allgemeines

Einmalpipettenspitzen, gestopft	Biozym
Einmalpipettenspitzen, ungestopft	Eppendorf
Falcons (15ml; 50ml)	BD
Fötale Kälber-Serum (FKS)	Biochrom AG
PBS (Phosphat buffered saline), pH7,3:	
8g NaCl	Merck
0,2g KCl	Merck
1,15g Na ₂ HPO ₄	Merck
0,2g KH ₂ PO ₄	Merck
ad 1l H ₂ O	
ProLine Einmal-Handschuhe	Asid Bonz
Schnappdeckelgefäße (0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Eppendorf

2.6.2 Molekularbiologische Untersuchungen

2.6.2.1 Nager-Sektion

Chloroform	Sigma Aldrich
Guanidinisothiocyanat-Puffer	
24g Guanidinisothiocyanat	Roth
4,4ml 0,2M EDTA pH 8,0	Merck
0,52g Triton X-100	Sigma Aldrich
20ml 0,1M Tris-Cl pH 6,4	Merck
bei 56°C im Wasserbad lösen	

2.6.2.2 Homogenisieren der Zecken

Kunststoff-Impfösen	Nunc
Stahlkugeln (3mm)	VWR
Zellkulturmedium (MEM Earle (1x) w 2,2g/l NaHCO ₃ , w stable glutamine) mit 0,1% Gentamycin	Biochrom AG

2.6.2.3 Extraktion von Nukleinsäuren

Maxwell TM 16 Tissue DNA Purification Kit	Promega
Nuclisens [®] easyMag TM Disposables and Silica	BioMerieux
Recombinant RNasin [®]	Promega

2.6.2.4 PCR

10x PCR Puffer	Applied Biosystems
AmpliTaq [®] DNA Polymerase	Applied Biosystems
dNTP-Set (100mM Solutions)	GE Healthcare
Glaskapillaren	Roche
LightCycler DNA Master HybProbe	Roche
LightCycler RNA Master HybProbe	Roche
MgCl ₂ (25mM)	Applied Biosystems
nukleasefreies Wasser	Promega
OneStep RT PCR Kit	Qiagen
PCR-Gefäße (0,2ml)	Biozym
Primer	TibMol
RNase Inhibitor	Qiagen
SuperScript III One-Step RT-PCR Kit	Invitrogen
TaqMan-Sonden	TibMol
Tris-HCl	Merck

2.6.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

100bp Ladder	Pharmacia
Ethidiumbromid (1%)	Merck
Ladepuffer	

4g Ficoll	Sigma
0,05g Bromphenolblau	Merck
ad 20ml H ₂ O	
peq GOLD Universal Agarose	Peqlab
TBE-Puffer (Tris-Borsäure-EDTA-Puffer)	
161,7g Tris	Merck
85,5g Borsäure	Merck
60ml 0,5M EDTA	Merck
ad 3l H ₂ O	

2.6.2.6 Sequenzierung

BigDye [®] Terminator v1.1 cycle sequencing kit	Applied Biosystems
DyeEx [™] 2.0 Spin Kit	Qiagen
Genetic Analyzer 0,5ml sample tubes	Applied Biosystems
Genetic Analyzer septa for 0,5ml sample tubes	Applied Biosystems
HiDi [™] -Formamid	Applied Biosystems
POP-6 (Performance optimized polymer 6)	Applied Biosystems
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
SDS (2,2%)	Serva

2.6.3 Serologische Untersuchungen

2.6.3.1 Komplementbindungsreaktion

<i>Coxiella burnetii</i> KBR Kit	Virion/Serion
----------------------------------	---------------

2.6.3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Immunozytm FSME all-species Kit	Progen
<i>R. conorii</i> ELISA IgG/IgM Kit	Biotrin/Vircell
Serion ELISA classic <i>Coxiella burnetii</i> Phase2 IgG	Virion/Serion
Stopplösung	KPL
TMB-Substrat	KPL

2.6.3.3 indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

<i>Rickettsia conorii</i> IgG IFA Kit, Human	Biozol/Fuller Labs
Deckgläser	Thermo Scientific
Einbettmedium	Meridian Bioscience
Evans Blue	BioMerieux
Polyclonal rabbit anti-mouse IgG/FITC, rabbit F(ab') ₂	Biozol/DAKO

2.6.4 FSME-Virus-Zellkultur

Antibiotika (Streptomycin 100µg/ml, Penicillin 100IU/ml, Gentamycin 100IU/ml)	Biochrom AG
Cryo Pure Gefäße 1,8ml	Sarstedt
sterile Spritzen (2ml)	Braun
Sterilfilter: Chromafil PES 20/25 -s- MN sterilizer (0,2µm Polyethersulfone)	Macherey-Nagel
Zellkulturflaschen Cellstar® 25cm ² red filter cap (T25)	Greiner Bio-one GmbH
Zellkulturmedium (MEM Earle (1x) w 2,2g/l NaHCO ₃ , w stable glutamine) mit 0,1% Gentamycin	Biochrom AG

2.6.5 Geräte

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Brutschrank	Heraeus
Elektrophorese-Kammer	Biorad
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Geldokumentationssystem	Bioprofil®, LTF Labortechnik
GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems
Hybridisierungssofen	Bachofer
HydroFlex Waschgerät	Tecan
Kamera für Geldokumentation	CCD
Kugelmühle MM400	Retsch
Kühlzentrifuge 5804R und 5402	Eppendorf
LightCycler 1.5	Roche
Maxwell™ 16	Promega

Nuclisens® easyMag™

BioMerieux

Sunrise ELISA-Reader

Tecan

Wasserbad

GFL

Zentrifuge Z233M-2

Hermle

2.7 COMPUTERPROGRAMME

BioEdit, Version 7.0.9.0

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

Phylip

<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

FigTree

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

MultAlign

<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>

3. Ergebnisse

3.1 *COXIELLA BURNETII*

3.1.1 Molekularbiologischer Nachweis von *C. burnetii*

Für den molekularbiologischen Nachweis von *C. burnetii* in Zecken und Nagerorganen wurde eine nested-PCR der IS1111-Region nach Fournier et al. (2003) durchgeführt.

Um festzustellen, ob sich Nagerorgane für den Nachweis von *C. burnetii* mittels PCR eignen, wurden in einem Vorversuch Organproben (Leber, Lunge, Milz, Niere) von Labormäusen präpariert und mit verschiedenen Konzentrationen des auch als Positivkontrolle verwendeten *C. burnetii*-Zellkulturüberstands versetzt. Auf diese Weise wurde zudem die Sensitivität der verwendeten PCR ermittelt.

Proben von jedem Organ wurden mit Verdünnungen des Zellkultur-Überstands von 10^7 Partikeln/ μ l bis 10^{-1} Partikeln/ μ l versetzt und in die DNA-Extraktion mittels Maxwell eingesetzt; anschließend wurde die nested-PCR der IS1111-Region durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Coxiellen bis zu einer Konzentration von 10 Partikeln/ μ l in allen Organen nachweisbar waren. Im Gegensatz zu Milz und Niere zeigten Leber- und Lungen-Proben auch bei einer Konzentration von 1 Partikel/ μ l positive Ergebnisse in der PCR (Abb. 23).

Somit kann *C. burnetii* mit der verwendeten Methodik in Nagerorganen prinzipiell nachgewiesen werden.

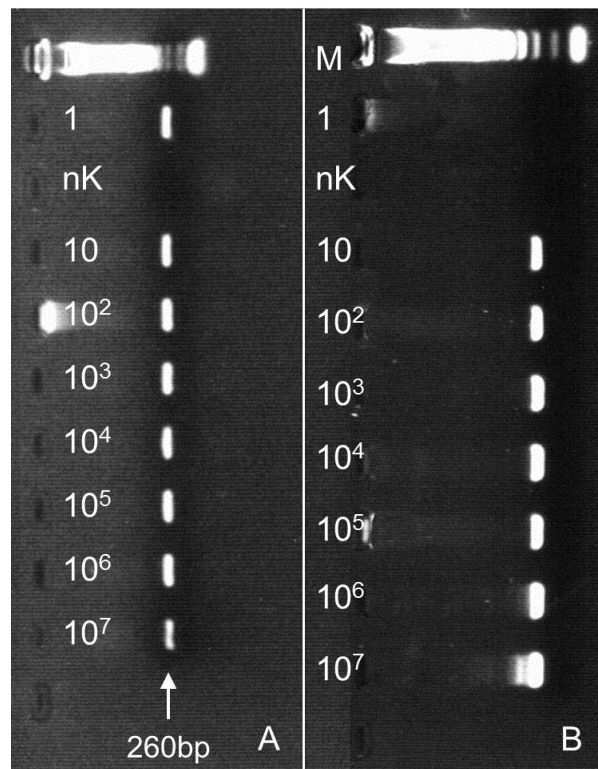


Abb. 23: „Spiken“ von Lunge (A) und Niere (B) von Labormäusen mit *C. burnetii*-Zellkultur-Überstand. Die Organe wurden vor der DNA-Extraktion mit je 1 µl Zellkulturüberstand-Verdünnung (1 - 10⁷ Partikel/µl) versetzt. M: Marker; nK: Negativkontrolle; 1-10⁷: Konzentration des eingesetzten Zellkulturüberstands in Partikeln/µl.

Insgesamt wurden mit der nested-PCR der IS1111-Region nach Fournier et al. (2003) 1120 *Dermacentor*-Zecken untersucht.

In keiner der untersuchten Zecken wurden Coxiellen nachgewiesen.

Für die Untersuchung der Nager mittels PCR wurden Organpools, bestehend aus Leber, Lunge, Milz und Niere, verwendet, da bisher nicht bekannt ist, welche Organe sich zum Nachweis von *C. burnetii* in infizierten Nagern am besten eignen.

Bei keinem der insgesamt 119 Nager wurde mittels PCR eine *C. burnetii*-Infektion festgestellt.

3.1.2 Serologischer Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der Nagerorgane wurden Blutproben (Serum oder Transsudat) der Tiere serologisch auf IgG-Antikörper gegen *C. burnetii* untersucht. Mit serologischen Verfahren lassen sich, im Gegensatz zum molekularbiologischen Nachweis der Erreger, nicht nur akute, sondern auch frühere

Infektionen detektieren, da die IgG-Antikörper auch nach Abklingen einer Infektion noch nachweisbar bleiben.

Neben der KBR wurde in dieser Arbeit ein ELISA zum serologischen Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern verwendet.

3.1.2.1 Komplementbindungsreaktion (KBR)

Der Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern in Nagerseren und -transsudaten mittels Komplementbindungsreaktion (KBR) erfolgte mit Hilfe eines für Humanseren entwickelten KBR-Kits (Virion/Serion). Da kein Serum eines mit Coxiellen infizierten Nagers zur Verfügung stand, wurden *C. burnetii*-positive Humanseren als Positivkontrollen verwendet. Fötale Kälberserum diente als Negativkontrolle. Um im positiven Fall die Bestimmung des Antikörpertiters zu ermöglichen, wurden die Nagerproben unverdünnt sowie in Verdünnungen von 1:2 bis 1:32 in die Reaktion eingesetzt. Zudem wurden für jede Probe Serumkontrollen (Verdünnungsstufen 1:2 und 1:4) mitgeführt.

Die als Positivkontrollen eingesetzten Humanseren zeigten in allen Versuchen positive Ergebnisse, während in den Negativkontrollen eine komplette Hämolyse und somit ein eindeutig negatives Ergebnis zu beobachten war. Die KBR konnte somit ausgewertet werden.

Für die ersten Versuche wurden zunächst zehn Transsudate verwendet. Dabei zeigten sich bei allen Proben auch in den Serumkontrollen, denen kein Antigen zugegeben wurde, positive Ergebnisse, was auf antikomplementäre Eigenschaften der Proben hindeutet. Im Gegensatz dazu wiesen die Positivkontrollen keine antikomplementären Eigenschaften auf, was die Funktionalität des Testverfahrens belegt. Im nächsten Versuch wurden dieselben Proben mit stärkeren Verdünnungen der Serumkontrolle (1:2 bis 1:32) erneut getestet; es zeigten sich jedoch wiederum positive Ergebnisse der Serumkontrollen.

Aufgrund der antikomplementären Eigenschaften der Proben erwies sich die KBR für die Untersuchung somit als ungeeignet. Aus diesem Grund wurde für die weitere Untersuchung ein ELISA verwendet.

3.1.2.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Für den Nachweis von Phase II-IgG-Antikörpern gegen *C. burnetii* in Nagertranssudaten und -seren mittels ELISA wurde ein für Humanseren entwickelter ELISA-Kit (Virion/Serion) mit einem Peroxidase-Konjugat (Progen) kombiniert. *C. burnetii*-positive Humanseren dienten als Positiv-, fötales Kälberserum als Negativkontrolle. Alle Proben (sowohl Seren als auch Transsudate) wurden in einer 1:100-Verdünnung eingesetzt.

In allen Testdurchläufen zeigten die Positivkontrollen eindeutig positive Ergebnisse mit OD-Werten über 2,0.

Dagegen lagen die OD-Werte aller Nagerseren und -transsudate unterhalb des Werts der Negativkontrolle, sodass alle Proben als negativ gewertet wurden.

3.1.3 Epidemiologische Daten

Insgesamt wurden 1016 *Dermacentor*-Zecken, die in neun Gebieten Süddeutschlands mit Zeckenfahnen gesammelt wurden, sowie 104 *Dermacentor* spp., die von Wild- und Haustieren aus unterschiedlichen Gebieten stammten, auf *C. burnetii* untersucht. Dabei wurden keine infizierten Tiere identifiziert (Tab. 11). Weiterhin wurden 119 Nager aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau sowohl molekularbiologisch als auch serologisch auf *C. burnetii*-Infektionen untersucht; hierbei wurden ebenfalls keine Infektionen festgestellt (Tab. 12).

Tab. 11: Anzahl der molekularbiologisch auf *C. burnetii* untersuchten *Dermacentor* spp.

Land-/Stadtkreis	Sammelgebiet	Zeckenart	abgesammelt von	
			Vegetation	Wirt
LK Lörrach	Istein	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i> <i>Dermacentor</i> spp.	39 156 456	
	Efringen-Kirchen	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	12 1	
LK Aschaffenburg	Kleinostheim	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	39 2	
SK Freiburg	Freiburg	<i>D. reticulatus</i>	41	
LK Ortenau	Kinzigtal	<i>D. marginatus</i>	17	
LK Karlsruhe	Eggenstein	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	48 148	4
	Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	54	3
	Graben-Neudorf	<i>D. reticulatus</i>	1	
	Hardtwald	<i>D. reticulatus</i>		73
LK Esslingen	Leinfelden-Echterdingen	<i>D. reticulatus</i>	2	
	Filderstadt	<i>D. reticulatus</i>		4
SK Köln	Köln	<i>D. marginatus</i>		15
LK Bad Dürkheim	Bad Dürkheim	<i>D. marginatus</i>		1
LK Breisgau-Hochschwarzwald	Bad Krozingen	<i>D. reticulatus</i>		2
LK Rastatt	Rheinmünster	<i>D. reticulatus</i>		1
LK Germersheim	Bienwald	<i>D. reticulatus</i>		1
gesamt (%)			1016	104

Tab. 12: Anzahl der molekularbiologisch und serologisch auf *C. burnetii* untersuchten Nager und Insectivora.

	Landkreis Ortenau	Landkreis Lörrach
<u>Arvicolidae</u>		
<i>Microtus arvalis</i>	26	83
<i>Arvicola terrestris</i>	3	0
<u>Muridae</u>		
<i>Apodemus</i> spp.	0	5
<u>Insectivora</u>		
<i>Sorex</i> spp.	0	2
gesamt	29	90

3.2 *RICKETTSIA* SPP.

3.2.1 Molekularbiologischer Nachweis von Rickettsien

Zum molekularbiologischen Nachweis von *Rickettsia* spp. in Zecken und Nagerorganen wurden drei unterschiedliche PCR-Systeme verwendet.

Die *Dermacentor*-Zecken wurden zunächst mit Hilfe einer TaqMan real-time PCR des *gltA*-Gens auf Rickettsien-Infektionen gescreent. Da mit dieser PCR jedoch keine Artdifferenzierung möglich war, wurde anschließend von allen positiven Proben eine Teilsequenz des *rOmpA*-Gens amplifiziert. Die Amplifikate dieser PCR wurden sequenziert, um die Rickettsienarten zu identifizieren. Einige der in der real-time PCR positiven Proben ließen sich in der *rOmpA*-PCR nicht amplifizieren. Für diese Proben wurde daher eine weitere *gltA*-Gen-PCR verwendet, deren Amplifikate ebenfalls sequenziert wurden.

Für die molekularbiologische Untersuchung der Nager wurden Organpools verwendet, die aus Leber, Lunge, Milz und Niere bestanden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da bisher nicht bekannt ist, welche Organe der Nager bei einer Rickettsien-Infektion von den Erregern befallen werden. Da nur wenige Nagerproben für die Untersuchung zur Verfügung standen, war ein anfängliches Screening mittels real-time PCR nicht nötig; diese Proben sollten daher direkt mit der *rOmpA*-PCR getestet und im positiven Fall sequenziert werden. Allerdings erwies sich diese PCR für die Nagerproben als ungeeignet, sodass diese im weiteren Verlauf ausschließlich mit der real-time *gltA*-PCR getestet wurden.

3.2.1.1 TaqMan real-time PCR des *gltA*-Gens

Die TaqMan real-time PCR des *gltA*-Gens (= Citratsynthase-Gen) wurde sowohl für *Dermacentor*-Zecken als auch für Nagerorgan-Pools verwendet. Die verwendeten Primer amplifizierten ein 70bp langes Fragment des *gltA*-Gens (Wölfel et al., 2008). In einem Vorversuch wurde die DNA verschiedener Rickettsien-Arten (*R. conorii*, *R. rickettsii* und *R. monacensis*) amplifiziert; auf diese Weise konnte die Spezifität der PCR bestätigt werden. In den weiteren PCR-Läufen diente DNA von *R. conorii* als Positivkontrolle.

Insgesamt wurden 1120 *Dermacentor* spp. mit der *gltA*-PCR untersucht, von denen 377 Rickettsien-positiv waren.

Im Gegensatz dazu erwiesen sich alle 119 Nagerorgan-Pools als negativ.

3.2.1.2 PCR des *rOmpA*-Gens

3.2.1.2.1 *Dermacentor*-Zecken

Mit Hilfe des Primerpaars Rr190.70p/Rr190.602n wurde ein 532bp langes Fragment des *rOmpA*-Gens amplifiziert. Die PCR wurde zunächst wie bei Regnery et al. (1991) beschrieben durchgeführt. Dabei zeigten sich im Agarosegel jedoch häufig unspezifische Banden unterschiedlicher Größen, die die Auswertung der PCR erschwerten. Um die Bildung dieser unspezifischen Produkte zu minimieren, wurde das Temperaturprofil der PCR schrittweise verändert. Die Annealingtemperatur wurde von 55°C auf 60°C erhöht, die Elongationstemperatur von 60°C auf 72°C. Die Elongationszeit wurde von 2min auf 1min verkürzt. Da diese Veränderungen keine wesentlichen Verbesserungen brachten, wurde die MgCl₂-Konzentration in 0,5mM-Schritten von 1,5mM bis 2,5mM variiert. Bei einer Konzentration von 2mM zeigten sich die wenigsten unspezifischen Banden im Gel; diese Menge wurde daher für die folgenden Untersuchungen beibehalten. Zudem wurden alle Reaktionsansätze auf Eis pipettiert, was die Zahl und Häufigkeit der unspezifischen Banden weiter verringerte. Auf diese Weise wurden für alle *Dermacentor*-Proben gute Ergebnisse erzielt, wobei unspezifische Banden entweder nicht mehr vorhanden waren oder sich anhand des Basenpaar-Markers eindeutig von der spezifischen Bande unterscheiden ließen (Abb. 24).

Insgesamt zeigten 350 von 1120 untersuchten *Dermacentor*-Proben positive Ergebnisse in der *rOmpA*-PCR.

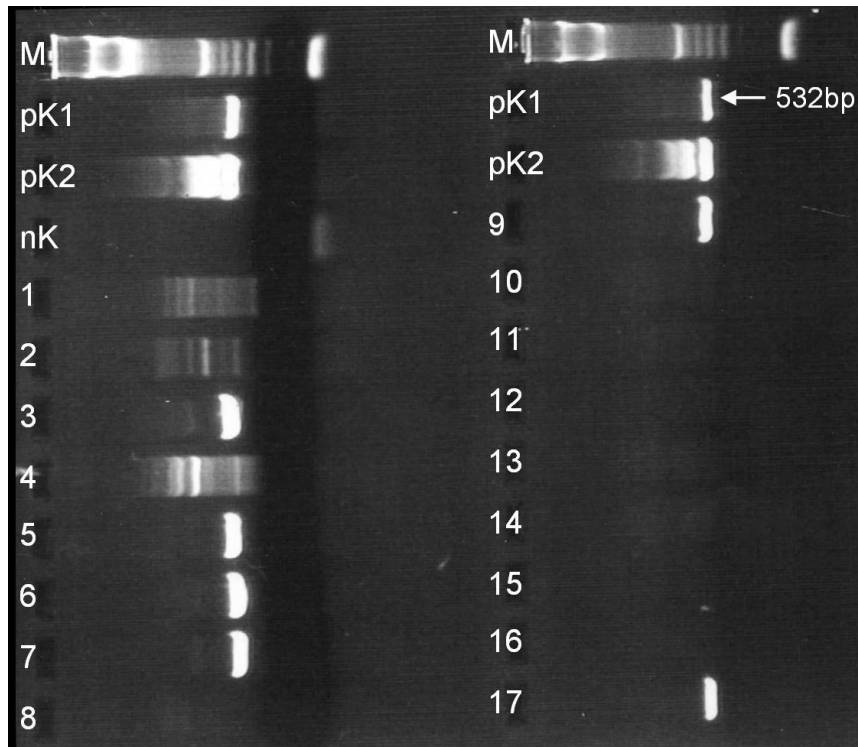


Abb. 24: Ergebnis einer *rOmpA*-PCR von *Dermacentor*-Zecken. Amplifiziert wurde ein 532bp großes Fragment des *rOmpA*-Gens, der Reaktionsansatz enthielt 2mM MgCl_2 . M: 100bp-Marker; pK1: Positivkontrolle (*R. conorii*-DNA); pK2: Positivkontrolle (*R. rickettsii*-DNA); nK: Negativkontrolle; 1-16 *Dermacentor* spp. Positive Proben (3, 5, 6, 7, 9, 17) sind gut von negativen Proben mit unspezifischen Banden (1, 2, 4) zu unterscheiden.

Bei 25 *Dermacentor*-Zecken aus Karlsruhe, die von Wildschweinen abgesammelt wurden, war die *rOmpA*-PCR zunächst negativ, obwohl die Proben zuvor in der *gltA*-real-time-PCR schwach positiv getestet wurden; diese wurden reamplifiziert. Hierfür wurde die *rOmpA*-PCR erneut durchgeführt, jedoch mit 2µl Amplifikat aus dem ersten PCR-Lauf als Template. Für neun Proben konnten auf diese Weise Amplifikate produziert werden, die sich für eine Sequenzierung eigneten. Die übrigen 16 Proben zeigten auch in der Reamplifikation negative Ergebnisse; sie wurden im Anschluss mit der *gltA*-PCR auf dem Blockcycler weiter untersucht.

3.2.1.2.2 Nagerorgan-Proben

Im Gegensatz zu den *Dermacentor*-Proben zeigten sich bei den Nagerorgan-Pools trotz der Modifikationen in jeder Probe sehr viele unspezifische Banden, die zum Teil kleiner oder größer, zum Teil aber auch ähnlich groß waren wie die Positivkontrolle (Abb. 25). Eine Auswertung der Proben war daher nicht möglich.

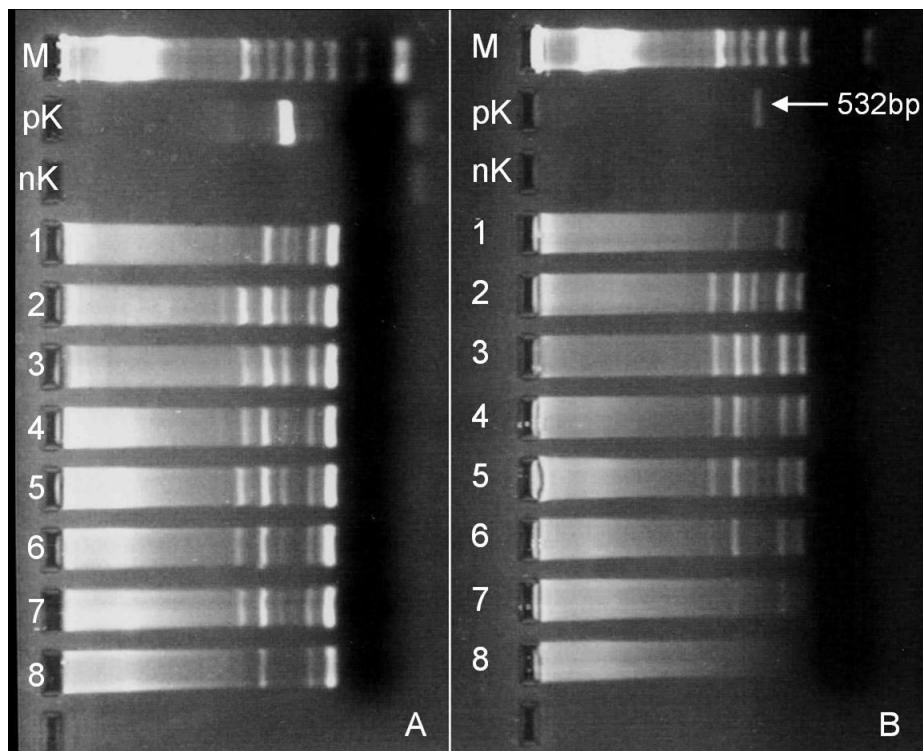


Abb. 25: Ergebnis einer *rOmpA*-PCR von Nagerorgan-Pools. Die PCR wurde mit 2mM (A) bzw. 1,5mM (B) MgCl_2 im Reaktionsansatz durchgeführt. Amplifiziert wurde ein 532bp großes Fragment des *rOmpA*-Gens. M: 100bp-Marker; pK: Positivkontrolle (*R. conorii*-DNA); nK: Negativkontrolle; 1-16: Nagerorgan-Pools.

Um auszuschließen, dass die Verwendung von Organpools die Ursache für die schlechten PCR-Ergebnisse war, wurden von zwei Nagern DNA-Aufreinigungen einzelner Organe (Leber, Lunge, Milz und Niere) angefertigt und in die PCR eingesetzt. Die unspezifischen Banden waren jedoch unverändert zu sehen.

In einem weiteren Versuch wurden aufgereinigte Nagerorgan-Pools mit unterschiedlichen Mengen an *R. conorii*-DNA versetzt. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob der Nachweis von Rickettsien-DNA in Nagerorganen mit dieser Methode grundsätzlich möglich ist. Wurden dem Reaktionsansatz 4,5µg *R. conorii*-DNA zugegeben (d.h. die Konzentration von *R. conorii*-DNA im 50µl-Ansatz betrug 90ng/µl), so zeigten sich im Gel sehr starke spezifische Banden, die sich deutlich von den schwächeren unspezifischen Banden unterscheiden ließen. Bei einer geringeren Menge an *R. conorii*-DNA (450ng und 45ng) war eine Unterscheidung der spezifischen und unspezifischen Banden jedoch nicht mehr möglich (Abb. 26). Da man jedoch bei infizierten Nagern von einer geringen Menge an Rickettsien-DNA in

den Organen ausgehen muss, erwies sich die *rOmpA*-PCR letztlich für die Nagerorgane als ungeeignet.

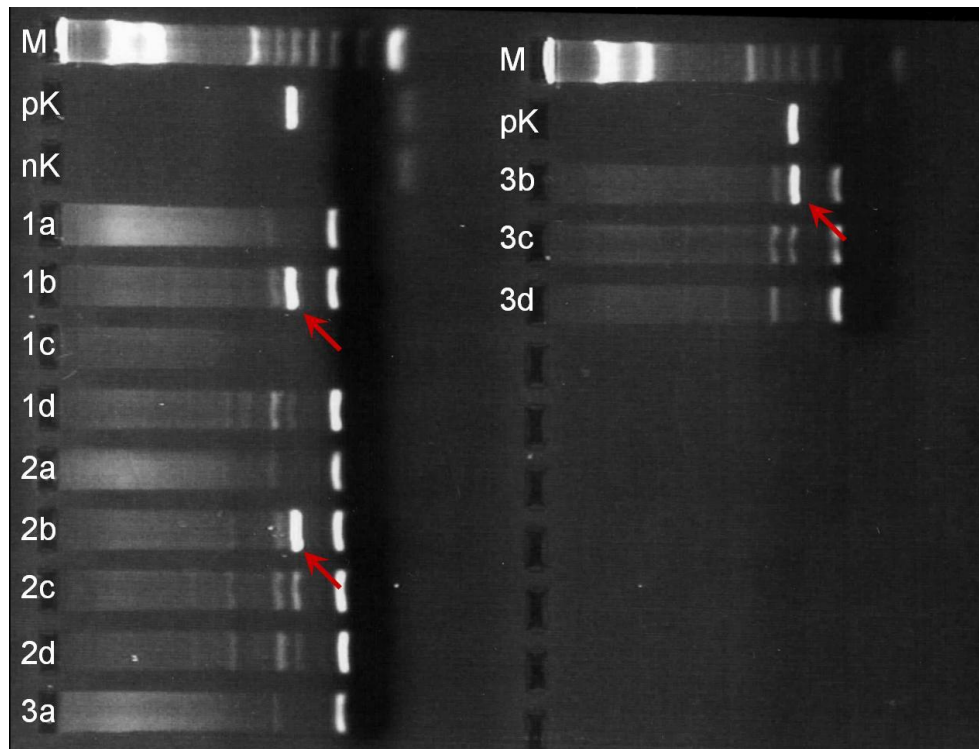


Abb. 26: Ergebnis einer *rOmpA*-PCR von drei Nagerorgan-Proben nach Spiken der Proben mit *R. conorii*-DNA. Es wurden reine Nagerproben (a) verwendet sowie Proben, die mit 4,5µg (b), 450ng (c) oder 45ng (d) *R. conorii*-DNA versetzt wurden. Die Pfeile zeigen die gut sichtbare spezifische Bande (532bp) bei Zugabe von 4,5µg Rickettsien-DNA. M: 100bp-Marker; pK: Positivkontrolle (*R. conorii*-DNA); nK: Negativkontrolle; 1-3: Nagerorgan-Pools.

3.2.1.3 PCR des *gltA*-Gens

Für 16 *Dermacentor*-Proben, die in der *gltA*-real-time-PCR schwach positiv, aber in der *rOmpA*-PCR negativ getestet wurden, wurde zusätzlich eine PCR des *gltA*-Gens auf dem Blockcycler durchgeführt. Die Primer RH314 und RH654 amplifizierten ein 341bp großes Fragment des *gltA*-Gens (Nilsson et al., 1999a). Vier der fraglichen Proben konnten mit dieser PCR erfolgreich amplifiziert werden, die übrigen 12 Proben blieben auch in dieser PCR negativ. Diese Zecken wurden daher als nicht Rickettsien-infiziert bewertet.

3.2.1.4 Sequenzierung der PCR-Produkte

Alle durchgeführten PCR-Untersuchungen waren spezifisch für die Gattung *Rickettsia*, sodass eine Artbestimmung anhand der PCR nicht möglich war. Die Amplifikate der *rOmpA*-PCR wurden daher sequenziert, um zu bestimmen, mit welchen Rickettsienarten die PCR-positiven Zecken infiziert waren. Für die Sequenzierung der *rOmpA*-Amplifikate wurden zunächst für zehn Proben sowohl der Primer Rr190.70p (forward) als auch der Primer 190.602n (reverse) verwendet. Da sich die Ergebnisse der Sequenzierungen jedoch für beide Ansätze nicht unterschieden, wurde für die übrigen Proben ausschließlich der Primer 190.70p eingesetzt.

Die erhaltenen Sequenzen wiesen nach Korrektur eine Länge von etwa 460bp auf. Mit Hilfe des Programms BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden diese mit den in der Gendatenbank GenBank (NCBI) vorhandenen Sequenzdaten verglichen. Auf diese Weise konnten zwei Rickettsienarten in den *Dermacentor*-Zecken nachgewiesen werden: 363 der 372 Proben zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit *R. raoultii* (GenBank-accession no. DQ365799, *Rickettsia raoultii* strain Marne); neun Proben stimmten zu 100% mit *R. slovaca* überein (GenBank-accession no. U43808, *Rickettsia slovaca*). Die Sequenzen aller als *R. raoultii* identifizierten Proben waren untereinander identisch, ebenso wie alle *R. slovaca*-Sequenzen. Der sequenzierte Bereich des *rOmpA*-Gens unterscheidet sich bei *R. raoultii* und *R. slovaca* in 31bp, sodass eine eindeutige Zuordnung der untersuchten Proben möglich war (Abb. 27).

```

>lcl|40401                                query: Rickettsia raoultii
Length=458                                Sbjct: Rickettsia slovaca

Score = 671 bits (363), Expect = 0.0
Identities = 429/460 (93%), Gaps = 7/460 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1  CAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCTTTATTACACCTCAACCGCAGCGATAATGCTGA 60
      |||
Sbjct 1  CAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCTTTATTACACCTCAACCGCAGCGATAATGCTGA 60

Query 61 GTAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATT--T-CTACTAATAATGCAGCAT 117
      |||
Sbjct 61 GTAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCAT 120

Query 118 TTAATGATCTTGCTGTTGCCA-A-TAATTGGAATGAGATAACGGCTAGAGGGGTAGCTAA 175
      |||
Sbjct 121 TTAGTGATAATGTTG--GCAATAATAATTGGAATGAGATAACGGCTGAGGGGTAGCTAA 178

Query 176 TGGTACTCCTGCTGGTGGTCCTCAAGACAATGGGGCATTCTACTTACGGTGGTGATCATAAC 235
      |||
Sbjct 179 TGGTACTCCTGCTGGCAGTCCTCAAAACAATTGGGCATTCTACTTACGGTGGTGATTATAC 238

Query 236 TATCACTGCAGATGAAGCAGGTCGTATTATTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCC 295
      |||
Sbjct 239 TATCACTGCAGATGCAGCCGATCGTATTATTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCC 298

Query 296 CGTAGGTCTAAATATTACTCAAAATACCGTAGTTGGTTCGATTGTGACGGGAGGTAACCT 355
      |||
Sbjct 299 CGTAGGTCTAAATATTGCTCAAAATACCGTCGTTGGTTCGATTATAACGAGAGGTAACCT 358

Query 356 GTTGCCTGTTACTATTACTGCTGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTACTAATGCTGTTGC 415
      |||
Sbjct 359 GTTGCCTGTTACTATTAAATGCCGGCAAAAGCTTAACTTTAAACGGTAAATAATGCTGTTGC 418

Query 416 TGCAATCATGGTTTTGATGCTCCTGCCGATAATTATACA 455
      |||
Sbjct 419 TGCAATCATGGTTTTGATTCTCCTGCCGATAATTATACA 458

```

Abb. 27: Ergebnis eines Sequenzvergleichs der *rOmpA*-Sequenzen von *R. raoultii* (Query) und *R. slovaca* (Sbjct), die aus *Dermacentor*-Zecken gewonnen wurden. Sequenzunterschiede sind grau hinterlegt. Das Alignment wurde mit BLAST Alin2Sequences durchgeführt.

Für vier Proben, bei denen die PCR des *rOmpA*-Gens keine positiven Ergebnisse erbrachte, wurden stattdessen die Amplifikate der *gltA*-Blockcycler-PCR zur Artbestimmung sequenziert. Hierfür wurde ausschließlich der Primer RH314 (forward) verwendet, da sich dieser in früheren Versuchen als besser geeignet erwiesen hatte (Hartelt, 2004).

Der Vergleich der 302bp langen Sequenzen mit der Datenbank erbrachte für diese Proben ebenfalls eine 100%ige Übereinstimmung mit *R. raoultii* (GenBank accession no. DQ365803, *Rickettsia raoultii* strain Marne). Auch hier waren die Sequenzen untereinander identisch.

3.2.2 Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern

Neben der molekularbiologischen Untersuchung mittels PCR wurden die Nager auch serologisch auf Rickettsien-Antikörper untersucht. Beim serologischen Nachweis von Antikörpern lassen sich anhand der Antikörperklassen frische Infektionen (IgM-Antikörper) von zurückliegenden Infektionen (IgG-Antikörper) unterscheiden. Zur Bestimmung der Seroprävalenz ist der Nachweis von persistierenden IgG-Antikörpern geeignet.

Für die Untersuchung kamen ein ELISA sowie ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) zum Einsatz.

3.2.2.1 ELISA

Für die Untersuchung der Nagerseren und -transsudate wurde ein für humane Serumproben entwickelter ELISA-Kit mit einer Protein G-Peroxidase kombiniert, die in der Lage ist, IgG-Antikörper verschiedener Tierarten zu binden. Für die Durchführung des ELISA stand kein Serum eines Rickettsien-infizierten Nagers zur Verfügung. Daher wurde als Positivkontrolle das Serum eines mit Rickettsien infizierten Hundes verwendet, das zuvor im Labor Parasitus Ex e.V. (Dr. Torsten Naucke, Niederkassel) untersucht wurde und dort im IIFT einen deutlich positiven Antikörpertiter von 1:640 zeigte.

In dem hier durchgeführten ELISA wurde das Hundeserum zunächst unverdünnt und in 1:20-Verdünnung eingesetzt. Dabei ergaben sich jedoch selbst für die unverdünnte Serumprobe sehr geringe OD-Werte ($OD=0,787$), die nur geringfügig über denen der Negativkontrolle ($OD=0,33$) lagen. Die OD-Werte von 50 Nagerproben, die für die ersten Versuche zufällig ausgewählt wurden, waren deutlich niedriger als die der Negativkontrolle (Mittelwert aus 75 Proben: $OD=0,25$), wobei sich kein Unterschied zwischen den Transsudaten und den Seren feststellen ließ. Da jedoch die Positivkontrolle kein eindeutig positives Ergebnis brachte, konnten diese Ansätze nicht gewertet werden.

In Untersuchungen am Mikrobiologischen Institut der Bundeswehr in München erwies sich der IIFT für die serologische Untersuchung von Nagern auf Rickettsien im Vergleich zum ELISA als besser geeignet (Dr. Gerhard Dobler, persönliche Mitteilung). Daher wurde die Etablierung des ELISA nicht weiter verfolgt, sondern stattdessen ein IIFT durchgeführt.

3.2.2.2 Indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT)

Da sich der Rickettsien-ELISA für die serologische Untersuchung der Nager als ungeeignet erwies, wurden die Proben stattdessen mit einem indirekten Immunfluoreszenztest (IIFT) untersucht. Hierfür standen Objektträger zur Verfügung, die mit Rickettsien-infizierten (*R. conorii* bzw. *R. helvetica*) Vero-Zellen beschichtet waren. Mit Hilfe des IIFT kann zwischen Antikörpern gegen Rickettsien der Fleckfieber- und der Zeckenstichfieber-Gruppe unterschieden werden; aufgrund von Kreuzreaktionen der Rickettsien-Antikörper und -Antigene innerhalb der Zeckenstichfieber-Gruppe ist eine Artbestimmung jedoch nicht möglich.

Alle Proben wurden zunächst mit *R. conorii*-Objektträgern getestet. Als Positivkontrolle diente das stark positive Serum einer Gelbhalsmaus. In Abb. 28 ist das IIFT-Ergebnis eines positiven (rechts) im Vergleich zu einem negativen Serum (links) dargestellt. Die auf den Objektträgern fixierten Zellen zeigen durch eine Gegenfärbung mit Evans Blue eine kräftige rote Farbe, während die Rickettsien bei positiven Proben durch die Markierung mit einem FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-gekoppelten Antikörper leuchtend grün erscheinen.

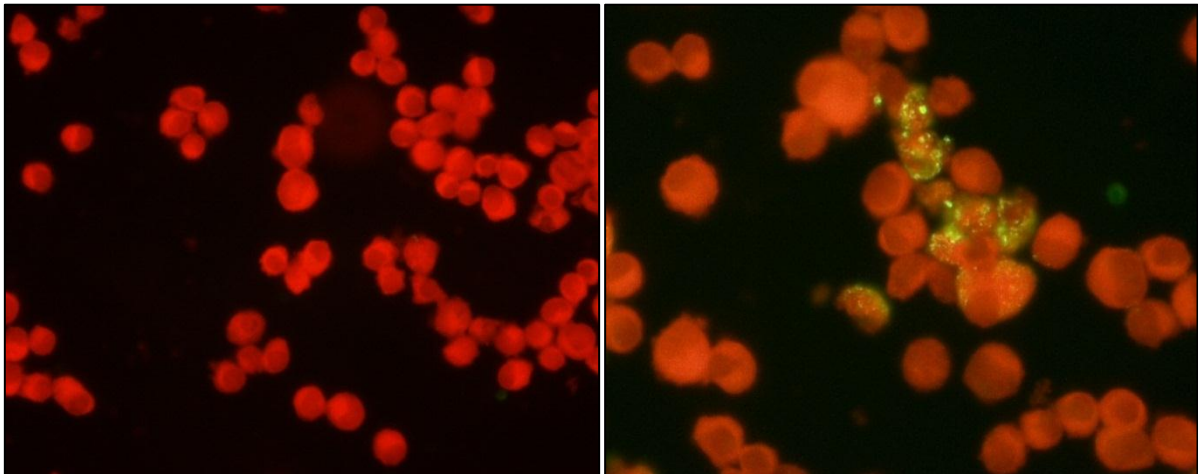


Abb. 28: Ergebnisse eines indirekten Immunfluoreszenztests mit *R. conorii*-beschichteten Objektträgern. Links: negatives Serum; Rechts: stark positives Serum einer Schermaus aus dem Ortenaukreis. Die auf den Objektträgern fixierten Verozellen erscheinen rot, die Rickettsien im positiven Fall leuchtend grün.

Insgesamt wurden 114 Nager aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau untersucht; für weitere 5 Nager standen keine Blutproben zur Verfügung. Je nach Untersuchungsgebiet wurden unterschiedliche Probenmaterialien verwendet: Von

den Nagern aus dem Ortenaukreis wurden Seren untersucht, von den Nagern aus dem Landkreis Lörrach dagegen Transsudate. Insgesamt konnten mit Hilfe des *R. conorii*-IIFT Rickettsien-Antikörper in 14 von 24 Seren aus dem Ortenaukreis sowie in 18 von 90 Transsudaten aus dem Landkreis Lörrach nachgewiesen werden.

Da die positiven Proben schon bei unverdünntem Einsatz häufig nur schwache Fluoreszenz zeigten, wurde auf die in der Diagnostik üblichen Verdünnungsreihen verzichtet.

Antikörper gegen *R. helvetica* zeigen weniger Kreuzreaktionen mit Antigenen anderer Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe; daher sind *R. helvetica*-Antikörper mit den verwendeten *R. conorii*-Objektträgern unter Umständen schlechter detektierbar. Um dies zu überprüfen, wurden alle Seren, alle im *R. conorii*-IIFT positiv getesteten Transsudate sowie einige der negativ getesteten Transsudate zusätzlich mit den *R. helvetica*-Objektträgern getestet. Dabei konnten Rickettsien-Antikörper in 10 von 24 Seren aus dem Ortenaukreis sowie in 13 von 34 Transsudaten aus dem Landkreis Lörrach nachgewiesen werden.

Für die meisten Proben zeigten *R. conorii*- und *R. helvetica*-Objektträger übereinstimmende Ergebnisse (Tab. 13). In einigen Fällen (5 Seren, 6 Transsudate) war nur der *R. conorii*-Test positiv. Ausschließlich im *R. helvetica*-Test positiv waren dagegen nur ein Serum und ein Transsudat. Jedoch lässt sich auch anhand der Ergebnisse zweier unterschiedlicher IIFT-Tests keine Artbestimmung der Rickettsien durchführen, da die erwähnten Kreuzreaktionen innerhalb der Zeckenstichfieber-Gruppe zu stark sind.

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse des *R. conorii*- und des *R. helvetica*-IIFT der Nagerproben aus den Kreisen Ortenau (Untersuchungsmaterial: Serum) und Lörrach (Untersuchungsmaterial: Transsudat). Aus dem Gebiet Lörrach sind nur diejenigen Transsudate berücksichtigt, für die sowohl der *R. conorii*- als auch der *R. helvetica*-IIFT durchgeführt wurde.

	<u>Ortenau</u> positiv/untersucht	<u>Lörrach</u> positiv/untersucht
<u>R. conorii- und R. helvetica-IIFT positiv</u>	9/24	12/34
<u>nur R. conorii-IIFT positiv</u>	5/24	6/34
<u>nur R. helvetica-IIFT positiv</u>	1/24	1/34
<u>R. conorii- und R. helvetica-IIFT negativ</u>	9/24	15/34

Zusätzlich wurden die Transsudate der für die Hantavirus-Untersuchung gefangenen Nager von der Schwäbischen Alb (Landkreise Reutlingen und Alb-Donau) auf Rickettsien-Antikörper untersucht. Da bei der Untersuchung der Nager aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau die Ergebnisse der *R. conorii*- und *R. helvetica*-Objektträger weitgehend übereinstimmten, wurden für die Nager von der Schwäbischen Alb nur die *R. conorii*-Objektträger verwendet. Dabei wurden in 14 von 119 Proben Antikörper nachgewiesen.

3.2.3 Epidemiologische Daten

3.2.3.1 Zecken

Insgesamt wurden 1120 adulte *Dermacentor*-Zecken aus verschiedenen Gebieten Süddeutschlands auf Rickettsien-Infektionen untersucht. Dabei handelte es sich zum einen um Freiland-Zecken (n=1016), die mit Zeckenfahnen von der Vegetation abgesammelt wurden. Zum anderen wurden nüchterne sowie vollgesogenen Zecken untersucht (n=104), die von Haus- und Wildtieren stammten (zur Verfügung gestellt von Dr. Trevor Petney und Jasmin Skuballa, KIT Karlsruhe; Dr. Gabriele Liebisch, ZeckLab Köln; Kathrin Schönfelder, Universität Hohenheim).

Von den 1016 Freilandzecken aus neun Gebieten Süddeutschlands wurden 155 als *D. marginatus* identifiziert und 405 als *D. reticulatus*. 456 Zecken aus Istein (Landkreis Lörrach) aus dem Jahr 2006 wurden nur bis zur Gattung als *Dermacentor* spp. bestimmt.

Rickettsien-positive *Dermacentor* spp. waren in sieben von neun Untersuchungsgebieten vorhanden; lediglich in Efringen-Kirchen (Landkreis Lörrach, n=13) und dem Kinzigtal (Landkreis Ortenau, n=17) wurden die Erreger nicht nachgewiesen. Die Rickettsienprävalenz lag insgesamt bei 31,4%. Mittels Sequenzierung konnte in 311 Zecken *R. raoultii* nachgewiesen werden (30,6%), während *R. slovaca*-Infektionen bei 8 Zecken (0,8%) festgestellt wurden (Tab. 14).

R. raoultii wurde in allen sieben Untersuchungsgebieten gefunden, wobei die Prävalenzen zwischen 32,1% (Eggenstein, n=196) und 39% (Freiburg, n=41) schwankten (Abb. 29). Lediglich in Kleinostheim wurde mit 2,4% eine geringere Befallsrate festgestellt. Aus Graben-Neudorf und Leinfelden-Echterdingen wurden

nur einzelne Zecken untersucht; für diese Gebiete wurden keine Prävalenzen berechnet.

Im Gegensatz zu *R. raoultii* wurde *R. slovaca* nur in Kleinostheim (Landkreis Aschaffenburg) sowie in Eggenstein und Karlsruhe (beide Landkreis Karlsruhe) nachgewiesen. Zudem war die Prävalenz von *R. slovaca* sowohl in Eggenstein (1%) als auch in Karlsruhe (1,9%) erheblich geringer als die *R. raoultii*-Prävalenz in denselben Gebieten. Dagegen war in Aschaffenburg die Befallsrate mit *R. slovaca* deutlich höher (12,2%) als die *R. raoultii*-Prävalenz (Abb. 29).

Zwischen *D. marginatus* und *D. reticulatus* zeigten sich starke Unterschiede in der Häufigkeit der Infektionen mit den beiden Rickettsienarten. So wurde *R. slovaca* in sechs *D. marginatus*, aber nur in zwei *D. reticulatus* nachgewiesen. *R. raoultii* konnte dagegen in 153 *D. reticulatus*, aber nur in einer einzigen *D. marginatus* identifiziert werden. Für 157 *R. raoultii*-positive Zecken aus Istein wurde die Zeckenart nicht bestimmt.

Tab. 14: Infektionsraten von wirtssuchenden *Dermacentor* spp. mit *Rickettsia* spp. Die Zecken wurden in verschiedenen Sammelgebieten Süddeutschlands mit der Zeckenfahne von der Vegetation abgesammelt.

Sammelgebiet	Land-/Stadtkreis	Zeckenart	untersucht/ <i>R. raoultii</i> -pos.	untersucht/ <i>R. slovaca</i> -pos.
Istein	LK Lörrach	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i> <i>Dermacentor</i> spp.	39/1 156/53 456/157	39/0 156/0 456/0
Efringen-Kirchen	LK Lörrach	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	12/0 1/0	12/0 1/0
Kleinostheim	LK Aschaffenburg	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	39/0 2/1	39/5 2/0
Freiburg	SK Freiburg	<i>D. reticulatus</i>	41/16	41/0
Kinzigtal	LK Ortenau	<i>D. marginatus</i>	17/0	17/0
Eggenstein	LK Karlsruhe	<i>D. marginatus</i> <i>D. reticulatus</i>	48/0 148/63	48/1 148/1
Karlsruhe	LK Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	54/18	54/1
Graben-Neudorf	LK Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	1/1	1/0
Leinfelden-Echterdingen	LK Esslingen	<i>D. reticulatus</i>	2/1	2/0
gesamt (%)			1016/311 (30,6%)	1016/8 (0,8%)

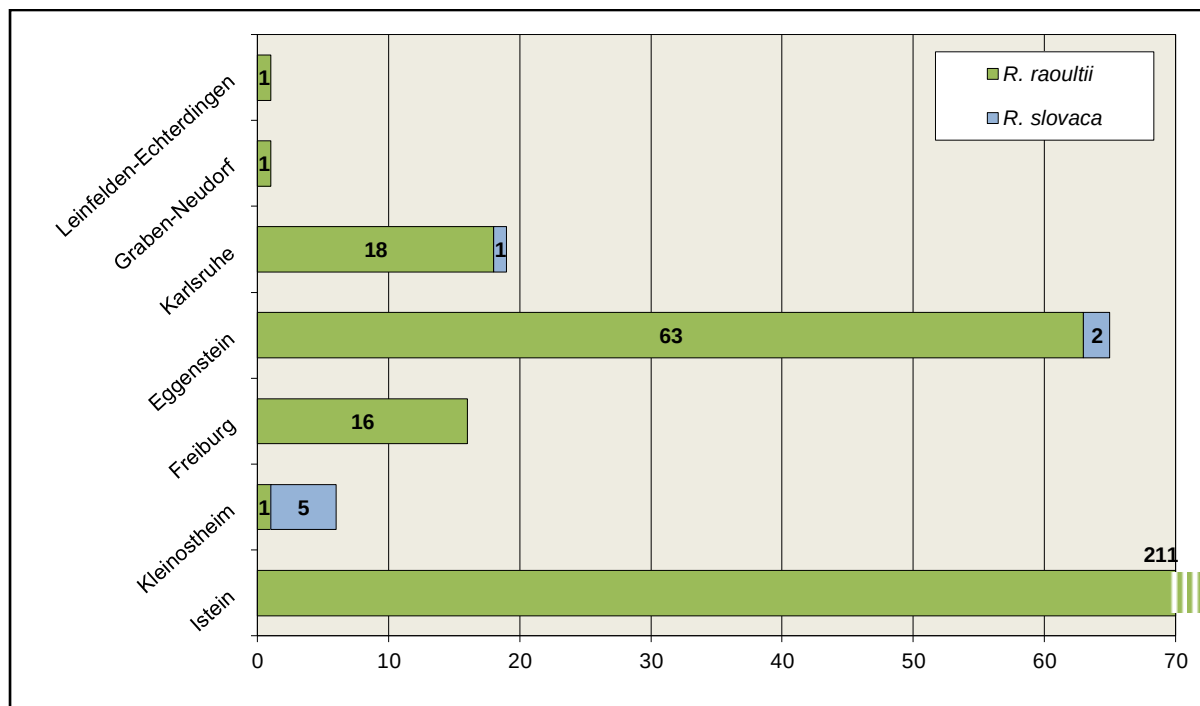


Abb. 29: Anzahl *R. raoultii*- und *R. slovaca*-infizierter *Dermacentor* spp. Dargestellt sind nur die Gebiete, in denen Rickettsien-infizierte Freilandzecken gefunden wurden.

Neben den Freilandzecken wurden 62 *D. reticulatus* untersucht, die von mehreren Wildschweinen aus dem Hardtwald bei Karlsruhe stammten. Dabei handelte es sich sowohl um nüchterne (n=36) als auch um vollgesogene (n=26) Zecken. Die molekularbiologische Untersuchung ergab insgesamt eine sehr hohe Rickettsien-Prävalenz von 69,4% (Tab. 15), wobei 78% der nüchternen und 58% der vollgesogenen Zecken infiziert waren. Zu beachten ist allerdings, dass die Zahl der untersuchten *D. reticulatus* sehr klein ist; ein Vergleich zwischen nüchternen und vollgesogenen Tieren ist daher nicht sinnvoll. In den positiven Zecken wurde mittels Sequenzierung ausschließlich *R. raoultii* identifiziert.

Tab. 15: Infektionsraten von *Dermacentor reticulatus* mit *Rickettsia raoultii*. Die Zecken wurden im Hardtwald im Landkreis Karlsruhe von Wildschweinen abgesammelt. Alle Rickettsien wurden mittels Sequenzierung als *R. raoultii* identifiziert. Zecken: n - nüchtern, v - vollgesogen

Sammelgebiet	Landkreis	Zecken	Zecken untersucht/ <i>R. raoultii</i> positiv
Hardtwald	Karlsruhe	n	36/28 (78%)
		v	26/15 (58%)
gesamt (%)			62/43 (69,4%)

Zusätzlich wurden 16 *D. marginatus* und 26 *D. reticulatus* in die Untersuchungen mit einbezogen, die von Haustieren (Hunde und Pferde) stammten (Tab. 16). Dabei wurde eine Gesamtprävalenz von *Rickettsia* spp. von 33,3% festgestellt; es zeigte sich somit eine ähnlich hohe Befallsrate wie unter den Freilandzecken (31,4%). Mittels Sequenzierung wurde in einer *D. marginatus* aus Köln *R. slovacica* nachgewiesen; *R. raoultii* wurde in 13 *D. reticulatus* aus den Kreisen Karlsruhe, Breisgau-Hochschwarzwald und Esslingen identifiziert.

Tab. 16: Infektionsraten von *Dermacentor* spp. mit *Rickettsia* spp. Die Zecken wurden in verschiedenen Gebieten Süddeutschlands von Haustieren abgesammelt. Status: n - nüchtern, v - vollgesogen.

Sammelgebiet	Land-/Stadtkreis	Zeckenart	Status	Zecken untersucht/positiv
Köln	SK Köln	<i>D. marginatus</i>	n v	11/1 * 4/0
Bad Dürkheim	LK Bad Dürkheim	<i>D. marginatus</i>	v	1/0
Hardtwald	LK Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	n v	6/3 5/2
Karlsruhe	LK Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	n	3/2
Eggenstein	LK Karlsruhe	<i>D. reticulatus</i>	n v	2/0 2/1
Bad Krozingen	LK Breisgau-Hochschwarzwald	<i>D. reticulatus</i>	n	2/1
Rheinmünster	LK Rastatt	<i>D. reticulatus</i>	n	1/0
Bienwald	LK Gernsheim	<i>D. reticulatus</i>	v	1/0
Filderstadt	LK Esslingen	<i>D. reticulatus</i>	n	4/4
gesamt (%)				42/14 (33,3%)

*: *R. slovacica*; alle anderen *Rickettsia* spp. wurden als *R. raoultii* identifiziert

3.2.3.2 Nager

Bei der molekularbiologischen Untersuchung von 119 Nagern aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau wurde in keiner Organprobe *Rickettsia* spp. nachgewiesen.

Dagegen zeigten sich bei der serologischen Untersuchung von 114 Nagern mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT) bei einem großen Teil der untersuchten Nager IgG-Antikörper gegen *Rickettsia* spp. der Zeckenstichfieber-Gruppe. So zeigten 15 von 24 Nagern aus dem Ortenaukreis (62,5%) sowie 19 von 90 Nagern aus dem Landkreis Lörrach (21,1%) positive Reaktionen im IIFT mit *R. conorii*- und/oder *R. helvetica*-beschichteten Objektträgern (Tab. 17).

Bei den untersuchten Nagern aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau handelte es sich in erster Linie um *Microtus arvalis* (91%, n=104). Zudem wurden drei *Arvicola*

terrestris, fünf *Apodemus* spp. und zwei *Sorex* spp. (Ordnung Insectivora) untersucht. Die meisten Rickettsien-Infektionen zeigten sich bei *M. arvalis*. So gehörten von den insgesamt 34 positiven Tieren 30 dieser Art an (88%). Daneben waren zwei *Arvicola terrestris* sowie zwei *Apodemus* spp. infiziert.

Tab. 17: Ergebnisse des indirekten Immunfluoreszenztests auf IgG-Antikörper gegen Rickettsien (*R. helvetica*- und *R. conorii*-Objektträger) von Nagern aus den Landkreisen Ortenau (Untersuchungsmaterial: Serum) und Lörrach (Untersuchungsmaterial: Transsudat)

	untersucht/pos. (%)	<i>Microtus arvalis</i> untersucht/pos.	<i>Apodemus</i> spp. untersucht/pos.	<i>Arvicola terrestris</i> untersucht/pos.	<i>Sorex</i> spp. untersucht/pos.
LK Ortenau	24/15 (62,5%)	21/13	0	3/2	0
LK Lörrach	90/19 (21,1%)	83/17	5/2	0	2/0
gesamt	114/34 (29,8%)	104/30	5/2	3/2	2/0

Weiterhin wurden 119 Nager von der Schwäbischen Alb, die für die Untersuchung auf Hantaviren gefangen wurden, ebenfalls mittels IIFT auf Rickettsien-Antikörper untersucht, um die Verbreitung von Rickettsien-Infektionen in weiteren Gebieten Süddeutschlands zu ermitteln. Die Tiere stammten von mehreren Sammelorten in den Gemeinden Römerstein (Landkreis Reutlingen) und Westerheim (Landkreis Alb-Donau). Insgesamt wurden bei 14 der 119 Nager Rickettsien-Antikörper nachgewiesen, was einer Seroprävalenz von 11,8% entspricht (Tab. 18). Die Prävalenzen in den einzelnen Gebieten lagen zwischen 0% in Zainingen (Gemeinde Römerstein) und 23,1% in Westerheim.

Aus den Untersuchungsgebieten der Schwäbischen Alb wurden vor allem *Myodes glareolus* (47,9%) und *Apodemus* spp. (30,3%), daneben einige *Microtus arvalis* (9,2%) und *Sorex* spp. (Insectivora; 12,6%) untersucht. Rickettsien-Antikörper wurden vor allem in *Apodemus* spp. (11 von 14 positiven Tieren, 78,6%) gefunden; daneben wurden 3 *Microtus arvalis* positiv getestet.

Tab. 18: Ergebnisse des indirekten Immunfluoreszenztests auf IgG-Antikörper gegen Rickettsien (*R. conorii*-Objektträger) von Nagern der Schwäbischen Alb (Landkreise Reutlingen und Alb-Donau). Untersuchungsmaterial: Transsudat.

	untersucht/pos. (%)	<i>Myodes glareolus</i> untersucht/pos.	<i>Microtus arvalis</i> untersucht/pos.	<i>Apodemus</i> spp. untersucht/pos.	<i>Sorex</i> spp. untersucht/pos.
Gemeinde Römerstein (LK Reutlingen)					
Böhringen	65/7 (10,8%)	36/3	4/0	17/4	8/0
Donnstetten	27/4 (14,8%)	8/0	5/0	8/4	6/0
Zainingen	14/0 (0%)	11/0	0	2/0	1/0
gesamt	106/11 (10,4%)	55/3	9/0	27/8	15/0
Gemeinde Westerheim (LK Alb-Donau)					
Westerheim	13/3 (23,1%)	2/0	2/0	9/3	0
gesamt	119/14 (11,8%)	57/3	11/0	36/11	15/0

Fasst man die Ergebnisse aller Untersuchungsgebiete zusammen, so ließen sich bei *Apodemus* spp. (31,7%, 13/41 Tiere) und *Microtus arvalis* (26,1%, 30/115 Tiere) besonders häufig Rickettsien-Antikörper nachweisen (Abb. 30). Dagegen zeigten sich nur in 3 von 57 untersuchten *Myodes glareolus* (5,3%) Hinweise auf Rickettsien-Infektionen. Darüber hinaus wurden 2 von 3 *Arvicola terrestris* positiv getestet.

Bei insgesamt 17 untersuchten *Sorex* spp. (Insectivora) zeigten sich dagegen in keinem Fall Rickettsien-Antikörper.

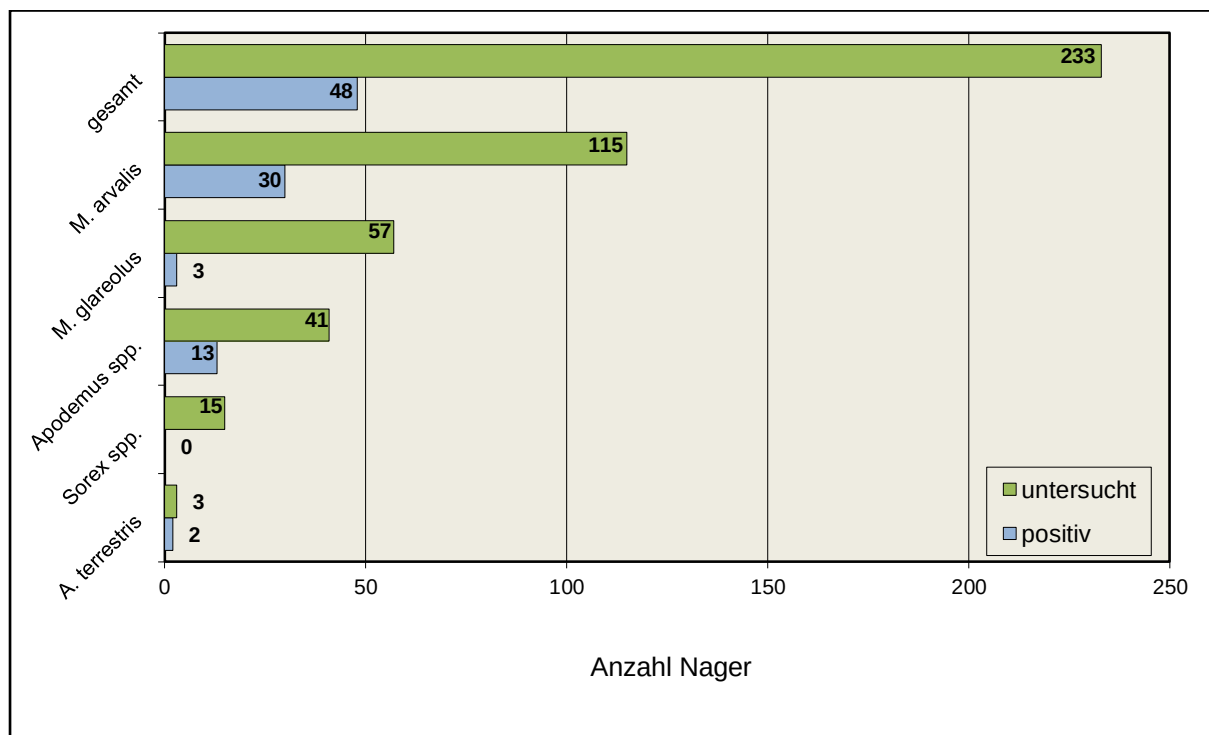


Abb. 30: Anzahl der in allen Gebieten untersuchten Tiere der Nager- bzw. Insectivora-Arten sowie der positiv auf Rickettsien-Antikörper getesteten Individuen jeder Art.

3.2.3.3 Geographische Lage der Fundorte

Abb. 31 zeigt die geographische Lage der Fundorte von *R. raoultii* und *R. slovaca* in *Dermacentor*-Zecken sowie von Rickettsien-Antikörpern in Nagern in Süddeutschland.

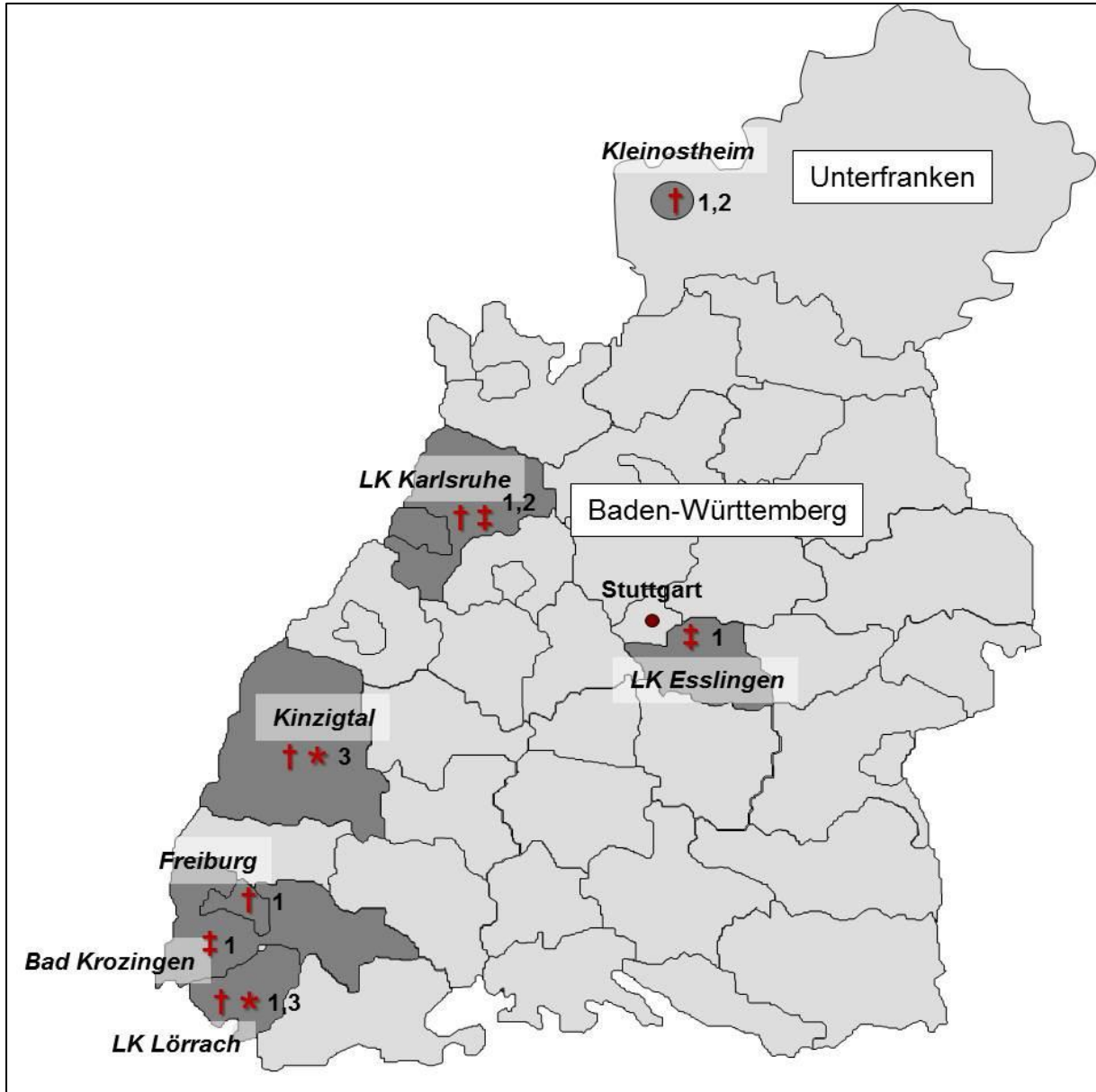


Abb. 31: Nachweis von *R. raoultii* (1) und *R. slovaca* (2) in *Dermacentor* spp. sowie von Antikörpern gegen *Rickettsia* spp. (3) in Nagern in Süddeutschland. Der Nachweis von *R. slovaca* in Köln ist nicht abgebildet. †: freilebende *Dermacentor* spp.; ‡: von Wirtstieren abgesammelte *Dermacentor* spp.; ★: Nager.

3.2.4 Nachweis einer *R. slovaca*-Infektion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Zusammenarbeit mit einem humandiagnostischen Labor (Labor Enders, Stuttgart) ein autochthoner Fall von zeckenübertragener Lymphadenitis durch *R. slovaca*-Infektion nachgewiesen werden. Die Patientin aus Rheinland-Pfalz entwickelte sieben Tage nach einem Zeckenstich typische Symptome einer Rickettsiose, darunter Fieber, Lymphadenitis der submandibulären Lymphknoten sowie ein Exanthem an der Stelle des Zeckenstichs. Im Labor Enders wurden serologische Untersuchungen mit Hilfe eines indirekten Immunfluoreszenztests auf Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe durchgeführt. Dabei wurden ein IgM-Antikörpertiter von 1:64 sowie ein IgG-Antikörper von 1:1024 festgestellt, was auf eine akute Rickettsiose hindeutete. In der Zecke, die als *Dermacentor* spp. identifiziert wurde, wurden mittels PCR Rickettsien nachgewiesen. Durch die anschließende Sequenzierung wurden die Erreger als *R. slovaca* identifiziert. Somit konnte die anfängliche Diagnose einer zeckenübertragenen Lymphadenitis bestätigt und der Erreger als *R. slovaca* identifiziert werden.

3.3 FSME-VIREN

3.3.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchung auf FSME-Viren wurden *I. ricinus* in 11 Untersuchungsgebieten im südlichen Baden-Württemberg mit Hilfe von Zeckenfahnen gesammelt. Da eine geringe Befallsrate der Zecken mit FSME-Viren zu erwarten war, wurden die Zecken in Pools zu je zehn Nymphen, fünf Weibchen bzw. fünf Männchen zusammengefasst und untersucht. Aus dem Untersuchungsgebiet Gengenbach standen nur wenige Zecken (304) zur Verfügung; diese wurden einzeln untersucht, um die tatsächliche FSME-Virus-Prävalenz ermitteln zu können.

Tab. 19 gibt einen Überblick über die Untersuchungsgebiete sowie die Zahl der untersuchten Zecken und Zeckenpools. Das Sammeln der Zecken sowie die Untersuchung auf FSME-Viren erfolgten im Rahmen der Diplomarbeiten von Jahn (2009) und Wessel (2010).

Tab. 19: Anzahl der untersuchten *I. ricinus* aus 11 Untersuchungsgebieten im südlichen Baden-Württemberg sowie der jeweils gebildeten Pools. OT: Ortsteil

Untersuchungsgebiet	Nymphen		Weibchen		Männchen		gesamt	
	Anzahl	Pools	Anzahl	Pools	Anzahl	Pools	Anzahl	Pools
Bodanrück	1048	105	69	14	58	12	1175	131
Hödinger Tobel	999	100	56	11	76	15	1131	126
Hagnau	968	97	99	20	100	20	1167	137
Oberprechtal	703	71	56	11	70	14	829	96
Botnang	742	75	28	6	25	5	795	86
Pulverdinger Holz	893	90	5	1	18	4	916	95
Großbottwar	634	64	53	11	57	12	744	87
Hausach, OT Hechtsberg	336	34	64	13	64	13	464	60
Hausach, OT Gechbach	131	14	12	3	16	4	159	21
Hausach, OT Hausach	137	14	13	3	8	2	158	19
Gengenbach	176	---	69	---	59	---	304	---
gesamt	6767	664	524	93	551	101	7842	858

3.3.2 Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren

Zum Nachweis von FSME-Viren in *I. ricinus* wurde eine FSME-Virus-spezifische realtime-PCR (Schwaiger und Cassinotti, 2003) durchgeführt. Die Zielsequenz dieser PCR ist ein 68bp großes DNA-Fragment der 3'-nichtkodierenden Region.

Insgesamt wurden 7842 Zecken (858 Pools sowie 304 Einzelzecken) mit dieser PCR untersucht; dabei wurden in insgesamt sechs Proben FSME-Viren nachgewiesen (Tab. 20). Bei zwei der positiven Proben handelte es sich um einzeln untersuchte Zecken aus Gengenbach. Zudem wurden zwei Pools aus Hagnau am Bodensee sowie je ein Pool aus dem Hödinger Tobel und aus Stuttgart-Botnang positiv getestet. Für die positiven Pools aus Hagnau am Bodensee und dem Hödinger Tobel standen zudem Homogenate der Einzelzecken zur Verfügung, die ebenfalls mittels PCR untersucht wurden. Dabei zeigte sich, dass jeweils nur eine einzige Zecke aus jedem positiven Pool mit FSME-Viren infiziert war.

Tab. 20: Übersicht über die in der FSME-Virus-spezifischen realtime-PCR positiv getesteten Zeckenproben.

Probe	Sammelort	Zeckenstadium	Probenart
GE-M 54	Gengenbach	Männchen	Einzelzecke
GE-W 37	Gengenbach	Weibchen	Einzelzecke
HB-W 35	Hagnau am Bodensee	Weibchen	Pool; Einzelzecke nachgetestet
HB-N 645	Hagnau am Bodensee	Nymphe	Pool; Einzelzecke nachgetestet
HT-N 682	Hödinger Tobel	Nymphe	Pool; Einzelzecke nachgetestet
BT-W 05	Stuttgart-Botnang	Weibchen	Pool

3.3.3 Anzucht der FSME-Viren

Um genügend Material für die spätere Charakterisierung der aus den Zecken isolierten FSME-Viren zur Verfügung zu haben, wurden die Viren zunächst auf PS-Zellen angezüchtet und über mehrere Zellkultur-Passagen vermehrt.

In fünf der sechs positiven Zellkulturen zeigte sich nach 5-7 Tagen ein vollständiger zytopathischer Effekt (= CPE); in allen weiteren Passagen trat dieser bereits nach 2-4 Tagen auf. Lediglich die Zellkultur, die mit FSME-Virus-positivem Homogenat aus Stuttgart-Botnang infiziert wurde, wies nur einen sehr schwachen CPE auf. In den

beiden darauffolgenden Passagen war keinerlei CPE mehr zu beobachten, eine Anzucht der Viren war in diesem Fall somit nicht möglich.

Nach jeder Zellkulturpassage wurde die RNA der geernteten Viren isoliert und mit Hilfe der FSME-Virus-spezifischen realtime-PCR analysiert. Dabei zeigten bis auf die Probe aus Stuttgart-Botnang alle Proben deutlich positive PCR-Ergebnisse, wodurch die mikroskopischen Beobachtungen bestätigt wurden.

3.3.3.1 Ermitteln der Viruskonzentration

Um die Vermehrung der FSME-Viren nach den einzelnen Zellkulturpassagen zu überprüfen, wurde die Konzentration an FSME-Viren in den Ausgangsproben sowie nach jeder Passage ermittelt; hierzu wurde mit Hilfe der FSME-Virus-spezifischen realtime-PCR eine Quantifizierung anhand einer Standardkurve durchgeführt.

Die infizierten Zecken wiesen Viruskonzentrationen zwischen $4,4 \times 10^6$ und $3,2 \times 10^8$ TCID₅₀/ml auf (Tab. 21). Nach der ersten Zellkulturpassage lagen die Viruskonzentrationen aller Proben um 4-5 Zehnerpotenzen höher, d.h. zwischen $1,0 \times 10^{10}$ und $4,5 \times 10^{13}$ TCID₅₀/ml. In den folgenden Zellkulturpassagen 2 und 3 war ein weiterer Anstieg der FSME-Virus-Konzentration auf $7,1 \times 10^{12}$ bis $6,7 \times 10^{13}$ TCID₅₀/ml zu beobachten. Für die vierte Zellkulturpassage wurde keine Quantifizierung durchgeführt; nach der fünften Passage zeigte sich jedoch eine leichte Abnahme der Viruskonzentration auf 2×10^7 bis $1,4 \times 10^{14}$ TCID₅₀/ml (Tab. 21). Insgesamt wurde somit eine deutliche Virusvermehrung über drei Zellkulturpassagen erreicht.

Tab. 21: Übersicht über die FSME-Virus-Konzentrationen der Zeckenproben und der Zellkulturüberstände nach fünf Zellkulturpassagen. Angaben in TCID₅₀/ml. nq = nicht quantifiziert. Die für die weiteren Untersuchungen verwendeten Zellkulturüberstände sind unterstrichen.

Probe	Zecke	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
GE-M 54	$3,2 \times 10^8$	$4,5 \times 10^{13}$	$5,7 \times 10^{13}$	$6,7 \times 10^{13}$	nq	$1,7 \times 10^{13}$
GE-W 37	3×10^8	3×10^{13}	<u>$2,5 \times 10^{13}$</u>	$6,6 \times 10^{13}$	nq	$1,4 \times 10^{12}$
HB-W 35	$4,4 \times 10^6$	1×10^{10}	$5,1 \times 10^{12}$	$7,1 \times 10^{12}$	nq	<u>$5,6 \times 10^{11}$</u>
HB-N 645	$2,9 \times 10^7$	$6,2 \times 10^{12}$	$4,4 \times 10^{13}$	$7,7 \times 10^{12}$	nq	<u>$5,2 \times 10^{12}$</u>
HT-N 682	2×10^7	<u>$1,3 \times 10^{13}$</u>	$1,4 \times 10^{14}$	$6,6 \times 10^{13}$	nq	$7,7 \times 10^{12}$

3.3.4 Charakterisierung der FSME-Viren

3.3.4.1 Blockcycler-PCR des E- und NS2a-Gens

Für die molekularbiologische Charakterisierung der FSME-Virus-Isolate wurde für jede Probe der Zellkulturüberstand einer Passage ausgewählt (siehe Tab. 21). Die Nukleinsäuren wurden extrahiert und für jede Probe das E-Gen und das NS2a-Gen mit Hilfe von FSME-Virus-spezifischen Blockcycler-PCR-Verfahren amplifiziert.

Das Amplifikat der E-Gen-PCR nach Kupca et al. (2010) zeigte eine Größe von 1687bp; neben dem etwa 1488bp großen E-Gen wurden ca. 200bp der in 5'- und 3'-Richtung angrenzenden Bereiche amplifiziert.

Die PCR des NS2a-Gens wurde von Dr. Sandra Essbauer (unveröffentlicht) übernommen. Das 1190bp große Amplifikationsprodukt umfasste neben dem 690bp großen NS2a-Gen ebenfalls die in 5'- und 3'-Richtung angrenzenden Bereiche (ca. 500bp).

In Abb. 32 ist das Ergebnis einer E-Gen- und NS2a-Gen-PCR dargestellt. In beiden Fällen zeigen sich sehr starke Banden, was auf eine große Menge an Amplifikat aufgrund einer großen Anzahl von template-RNA in der Probe hindeutet. Dies stimmt mit der FSME-Virus-Quantifizierung in den Zellkulturüberständen überein, bei der eine hohe Konzentration an FSME-Viren festgestellt wurde.

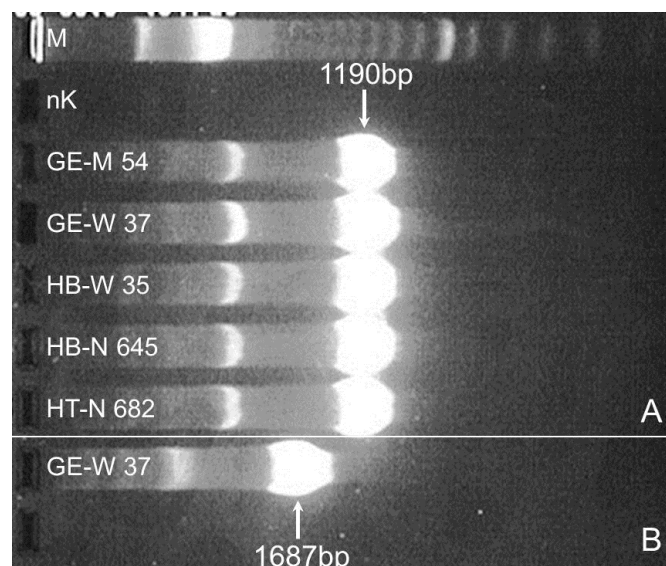


Abb. 32: Ergebnis der NS2a-Gen- (A) und E-Gen-PCR (B) der für die FSME-Virus-Charakterisierung verwendeten Zellkulturüberstände. M: Marker.

3.3.4.2 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der E-Gen- und NS2a-Gen-Amplifikate der fünf FSME-Virus-Isolate wurden mit Hilfe mehrerer Primer jeweils kürzere Teilstücke sequenziert und anhand von überlappenden Bereichen zusammengesetzt.

Für die NS2a-Gen-Amplifikate wurde die Sequenzierung mit dem forward- sowie dem reverse-Primer durchgeführt. Die korrigierten und zusammengesetzten Sequenzen wiesen jeweils eine Länge von 1136bp auf.

Für die E-Gen-Amplifikate erfolgte die Sequenzierung ebenfalls mit dem forward- und dem reverse-Primer. Zusätzlich kamen zwei zueinander komplementäre Primer zum Einsatz, deren Zielsequenz sich innerhalb des Amplifikationsprodukts befand. Die vier so erhaltenen Sequenzen wurden wiederum zusammengesetzt, sodass sich Gesamtsequenzen von einer Länge von jeweils 1642bp ergaben.

Die zusammengesetzten Sequenzen wurden zunächst untereinander mit Hilfe von multiplen Sequenz-Alignments verglichen (Tab. 22).

Innerhalb eines Untersuchungsgebiets unterschieden sich die erhaltenen Sequenzen kaum voneinander. Die beiden Isolate aus Gengenbach, GE-M 54 und GE-W 37, waren sowohl in den E-Gen- als auch in den NS2a-Gen-Sequenzen identisch, während die beiden Proben aus dem Gebiet Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645) in beiden Sequenzen Unterschiede in lediglich zwei Nukleotid-Positionen aufwiesen.

Zwischen den Proben verschiedener Untersuchungsgebiete waren die Ähnlichkeiten deutlich geringer. Die Isolate aus Gengenbach und Hagnau am Bodensee unterschieden sich in 28-32 Positionen. Das FSME-Virus-Isolat aus dem Gebiet Hödinger Tobel wich sowohl im E- als auch im NS2a-Gen deutlich von allen anderen Sequenzen ab; es zeigten sich Unterschiede in 35-43 Positionen.

Tab. 22: Nukleotid-Unterschiede in den E-Gen- und NS2a-Gen-Sequenzen der FSME-Virus-Isolate aus *I. ricinus*. Die Unterschiede im E-Gen sind grau hinterlegt, diejenigen im NS2a-Gen weiß.

	GE-M 54	GE-W 37	HB-W 35	HB-N 645	HT-N 682
GE-M 54		0	28	30	35
GE-W 37	0		28	30	35
HB-W 35	32	32		2	41
HB-N 645	30	30	2		43
HT-N 682	41	41	43	41	

Im nächsten Schritt wurden die DNA-Sequenzen der fünf FSME-Virus-Isolate mit Sequenzdaten aus der Gendatenbank GenBank (NCBI) verglichen, um zu ermitteln, welchen Virusstämmen die einzelnen Isolate zuzuordnen sind. Hierzu wurde das Programm BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet.

Die Ergebnisse des Datenbankabgleichs für die E-Gen-Sequenzen sind in Tab. 23 dargestellt. Die beiden Proben aus Hagnau am Bodensee wurden als FSME-Virus-Stamm Salem identifiziert. Beide Proben unterschieden sich in lediglich 3 bzw. 5 Nukleotiden von der in der Datenbank hinterlegten Sequenz des Stamms Salem, wohingegen sich zu anderen Stämmen Unterschiede in mindestens 27 Nukleotiden zeigten.

Die beiden Proben aus Gengenbach wiesen mit jeweils 29 Nukleotid-Unterschieden die größte Ähnlichkeit mit den FSME-Virus-Stämmen Salem und Kumlinge auf. Der Vergleich mit anderen Stämmen zeigte Abweichungen in mehr als 32 Nukleotidpositionen.

Die Probe aus dem Gebiet Hödinger Tobel unterschied sich in 38 Nukleotiden vom Virusstamm Kumlinge; von den Stämmen Neudoerfl und Salem wich die Sequenz in 39 bzw. 40 Positionen ab.

Tab. 23: Vergleich der E-Gen-Sequenzen mit Sequenzdaten der Gendatenbank GenBank (NCBI) mittels BLAST. Angegeben sind die prozentuale Übereinstimmung der Sequenzen sowie die Zahl der Nukleotidunterschiede (nt). Es wurden nur Stämme mit hoher prozentualer Übereinstimmung (97-99%) berücksichtigt. Für jede Sequenz ist der Stamm mit der größten Übereinstimmung grau hinterlegt.

FSME-Virus-Stamm	accession no.	GE-M 54/W 37	HB-W 35	HB-N 645	HT-N 682
Salem	FJ572210	99% / 29nt	99% / 5nt	99% / 3nt	98% / 40nt
Kumlinge	AY268437	99% / 29nt	99% / 29nt	99% / 27nt	98% / 38nt
Neudoerfl	U27495	99% / 32nt	98% / 34nt	99% / 32nt	98% / 39nt
263	DQ153877	98% / 36nt	98% / 34nt	99% / 32nt	98% / 41nt
AS33	GQ266392	98% / 38nt	98% / 40nt	98% / 38nt	98% / 41nt
K23	AM600965	98% / 45nt	98% / 42nt	98% / 40nt	98% / 42nt
Hyp	U39292	98% / 44nt	98% / 46nt	98% / 44nt	97% / 51nt

In Tab. 24 sind die Ergebnisse des Datenbankabgleichs für die NS2a-Gen-Sequenzen dargestellt. Ein Vergleich mit dem Stamm Kumlinge war für das NS2a-

Gen nicht möglich, da in der Datenbank bisher keine geeigneten Vergleichssequenzen verfügbar sind.

Die beiden Proben aus Hagnau am Bodensee konnten auch anhand der NS2a-Gen-Sequenzen eindeutig als FSME-Virus-Stamm Salem identifiziert werden; sie unterschieden sich lediglich in 1 bzw. 3 Nukleotiden von der Sequenz in der Datenbank.

Die Proben aus Gengenbach zeigten die höchste Übereinstimmung (25 Nukleotid-Unterschiede) mit dem Stamm K23; von anderen FSME-Virus-Stämmen wichen die Sequenzen in mehr als 26 Nukleotiden ab.

Für die Probe aus dem Gebiet Hödinger Tobel war auch anhand der NS2a-Gen-Sequenz keine eindeutige Zuordnung zu einem Stamm möglich. Die größte Ähnlichkeit (36 Nukleotid-Unterschiede) zeigte sich zum Stamm AS33, während sich die Sequenz in mindestens 37 Nukleotiden von den übrigen FSME-Virus-Stämmen unterschied.

Tab. 24: Vergleich der NS2a-Gen-Sequenzen mit Sequenzdaten der Gendatenbank GenBank (NCBI) mittels BLAST. Angegeben sind die prozentuale Übereinstimmung der Sequenzen sowie die Zahl der Nukleotidunterschiede (nt). Es wurden nur Stämme mit hoher prozentualer Übereinstimmung (96-99%) berücksichtigt. Für jede Sequenz ist der Stamm mit der größten Übereinstimmung grau hinterlegt.

FSME-Virus-Stamm	accession no.	GE-M 54/W 37	HB-W 35	HB-N 645	HT-N 682
Salem	FJ572210	98% / 29nt	99% / 1nt	99% / 3nt	97% / 42nt
Neudoerfl	U27495	98% / 32nt	97% / 40nt	97% / 42nt	97% / 45nt
263	DQ153877	98% / 26nt	99% / 12nt	99% / 14nt	97% / 38nt
AS33	GQ266392	98% / 27nt	98% / 33nt	97% / 35nt	97% / 36nt
K23	AM600965	98% / 25nt	98% / 26nt	98% / 29nt	97% / 37nt
Hypr	U39292	97% / 35nt	97% / 39nt	97% / 41nt	96% / 46nt

3.3.5 Phylogenetische Analysen

Anhand der Sequenzen des E- und des NS2a-Gens wurden Stammbäume erstellt, um eine weitergehende Charakterisierung der FSME-Viren aus *I. ricinus* zu ermöglichen. Für die Stammbaumberechnung wurde zum einen die „Neighbour Joining“-Methode, zum anderen die „Maximum-Parsimony“-Methode verwendet. Die Stammbäume wurden sowohl anhand der Nukleotidsequenzen als auch anhand der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen berechnet.

Neben den Sequenzen der FSME-Virus-Isolate wurden die E-Gen- bzw. NS2a-Gen-Sequenzen von 23 bzw. 24 FSME-Virus-Stämmen sowie von zwei weiteren Flaviviren (Louping ill-Virus und Omsk Hämorrhagisches Fieber-Virus) in die Berechnungen mit einbezogen. Als Außengruppe dienten Sequenzen des Omsk Hämorrhagischen Fieber Virus. Durch die Einbeziehung einer Außengruppe ist es möglich, „gewurzelte“ oder gerichtete Bäume zu berechnen.

Für die Berechnung der E-Gen- und NS2a-Gen-Stammbäume wurden möglichst dieselben Virusstämme verwendet, um einen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen. Lediglich für den Stamm Kumlinge sind bisher keine NS2a-Gen-Sequenzen verfügbar, sodass dieser Stamm nur in den E-Gen-Stammbaum einbezogen werden konnte. Die accession numbers sowie weitere Informationen zu den verwendeten FSME-Virus-Stämmen und Flaviviren sind im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Als Grundlage für die Berechnung der Stammbäume wurden mit Hilfe des Programms BioEdit multiple Sequenzalignments berechnet. Nach Kürzung aller Sequenzen auf eine einheitliche Länge stand für das E-Gen ein 1490bp langes Alignment zur Verfügung, für das NS2a-Gen ein Alignment von 1136bp Länge. Die daraus abgeleiteten Alignments auf Basis der Aminosäuren wiesen Längen von 496 Aminosäuren (E-Gen) und 378 Aminosäuren (NS2a-Gen) auf.

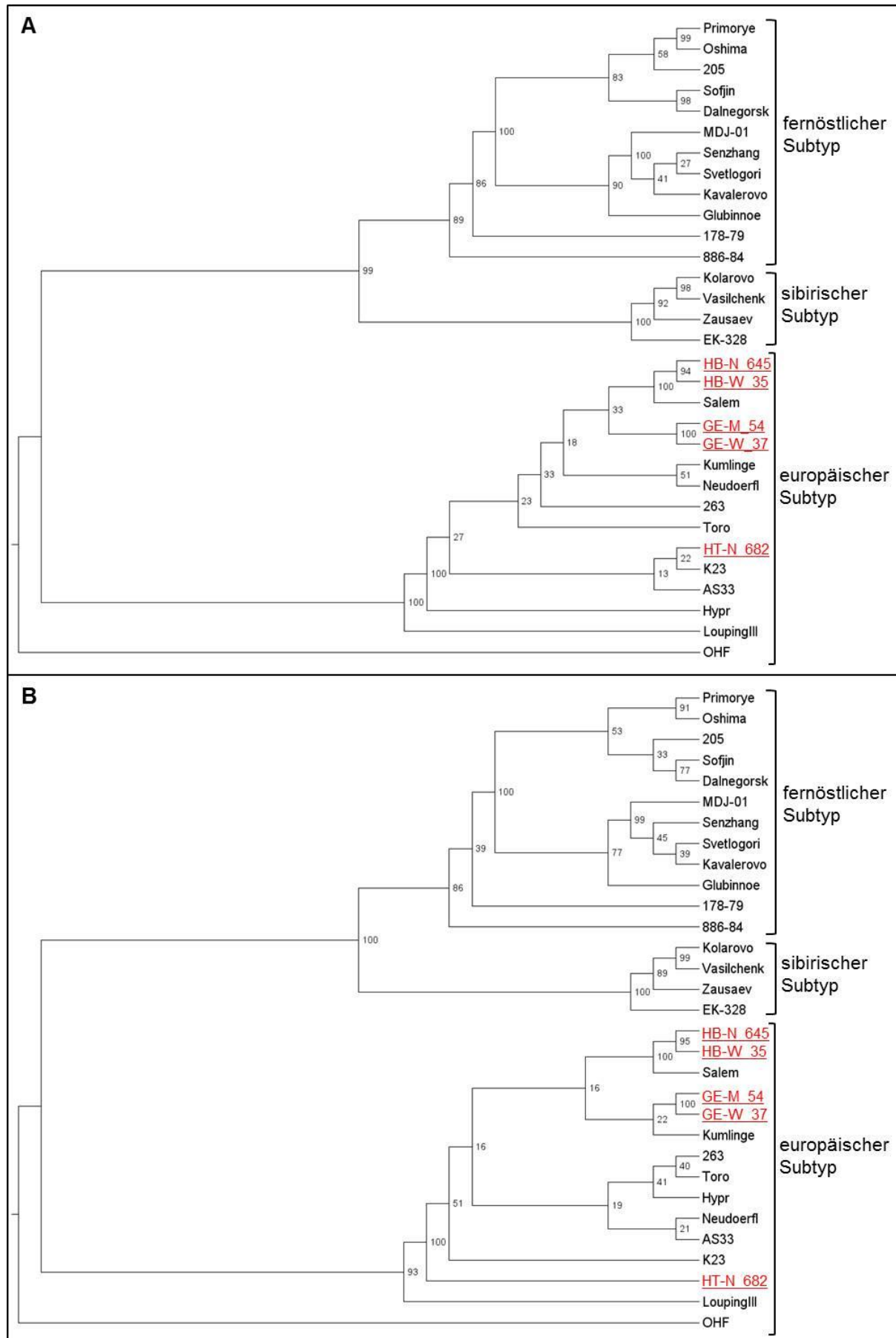
Für jeden Stammbaum wurden zudem Bootstrap-Werte (Bt) berechnet, die ein Maß für die Zuverlässigkeit des Baumes bzw. der einzelnen Cluster sind. In allen berechneten Stammbäumen sind die Bootstrap-Werte innerhalb des fernöstlichen und sibirischen Subtyps in der Regel hoch (meist >70), wohingegen sich innerhalb des europäischen Subtyps häufig niedrige oder sehr niedrige Bootstrap-Werte zeigen (Abb. 33-37).

3.3.5.1 *Stammbauberechnung mit Neighbour Joining*

Die mittels Neighbour Joining berechneten FSME-Virus-Stammbäume sind in Abb. 33 und Abb. 34 dargestellt. Die Einteilung der Virusstämme in fernöstlichen, sibirischen und europäischen Subtyp spiegelt sich in allen Bäumen wider; die phylogenetischen Beziehungen innerhalb des fernöstlichen und sibirischen Subtyps stellen sich zudem weitgehend identisch dar. Auch der zum Vergleich in die Berechnungen mit einbezogene Vertreter der Flaviviren, das Louping-ill-Virus, zeigt in allen Stammbäumen dieselbe Position in unmittelbarer Nähe des europäischen Subtyps (Bt 82-100).

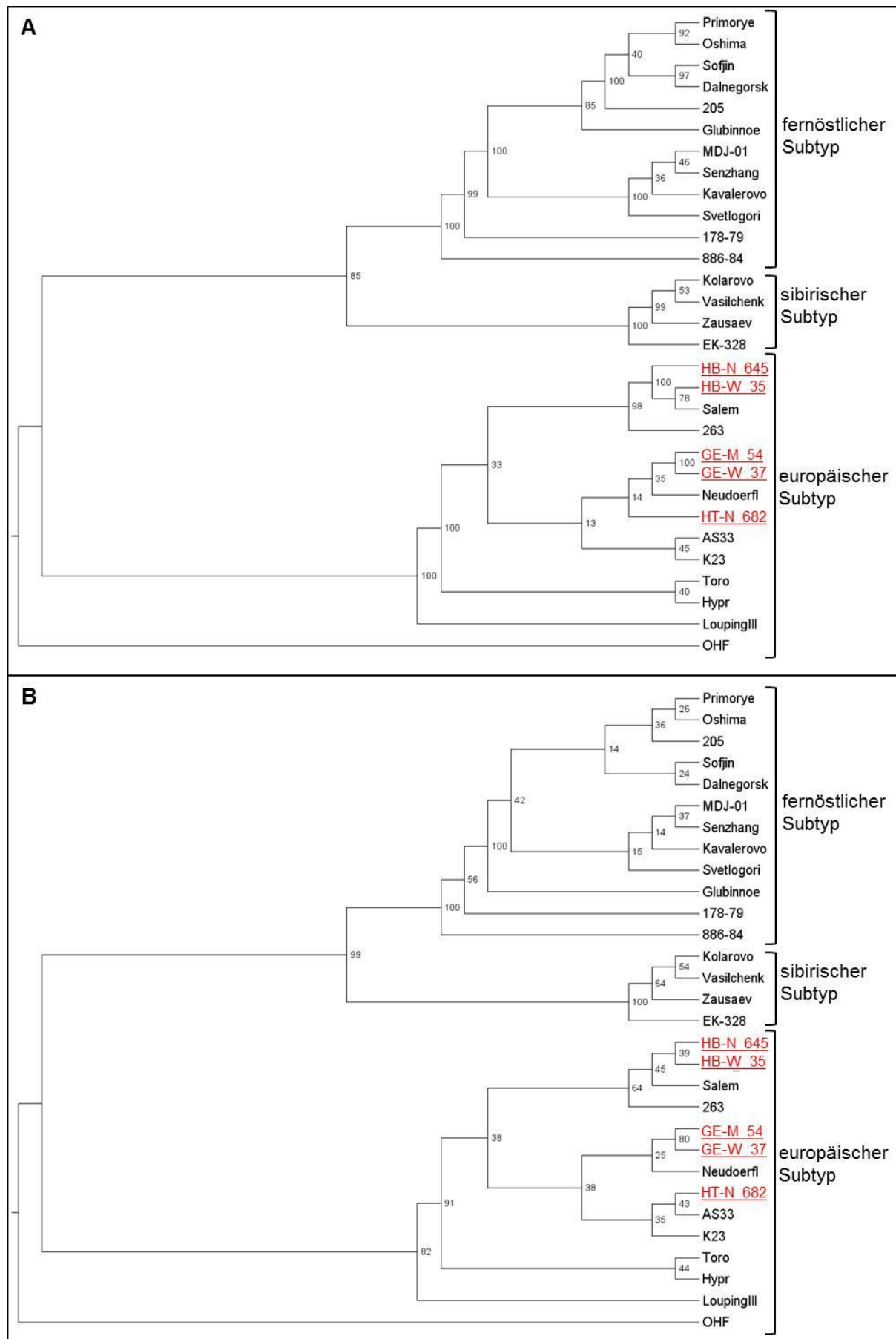
Im **E-Gen-Stammbaum** auf Basis der Nukleotidsequenzen (Abb. 33A) bilden die Virus-Isolate aus Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645) eine Gruppe mit dem Virusstamm Salem (Bt 100). Die untereinander identischen Isolate aus Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) bilden hierzu eine Schwestergruppe (Bt 33). Alle vier Isolate befinden sich in diesem Stammbaum in unmittelbarer Nähe zu den Virusstämmen Neudoerfl und Kumlinge (Bt 18), die eine gemeinsame Gruppe bilden. Das FSME-Virus-Isolat aus dem Gebiet Hödinger Tobel (HT-N 682) wird hingegen zum Virusstamm K23 gruppiert (Bt 22) und befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Stamm AS33 (Bt 13). Berechnet man den Stammbaum auf Basis der Aminosäuresequenzen (Abb. 33B), so bilden die Proben GE-M 54 und GE-W 37 ein Cluster mit dem Virusstamm Kumlinge (Bt 22), während die Isolate HB-N 645 und HB-W 35 wiederum gemeinsam mit dem Stamm Salem gruppiert werden (Bt 100). Das Isolat HT-N 682 bildet einen eigenen Ast in unmittelbarer Nähe des Stamms K23 (Bt 100).

Abb. 33: FSME-Virus-Stammbaum anhand von **E-Gen-Sequenzen**. Die Berechnung mittels Neighbour Joining wurde sowohl auf Nukleotid- (A) als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene (B) durchgeführt. Die FSME-Virus-Isolate aus den Gebieten Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645), Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) und Hödinger Tobel (HT-N 682) sind rot hervorgehoben. Die GenBank-accession numbers der Virusstämme sind im Anhang aufgeführt. Die Stammbäume wurden mit dem Omsk Hämorrhagischen Fieber-Virus (OHF) als Außengruppe gewurzelt. An den Knotenpunkten sind Bootstrap-Werte, berechnet anhand von 100 Wiederholungen, angegeben.



Im **NS2a-Gen-Stammbaum** auf Basis der Nukleotidsequenzen (Abb. 34A) bilden die Isolate HB-W 35 und HB-N 645 ebenfalls eine Gruppe mit dem Virusstamm Salem (Bt 100). Sowohl HT-N 682 (Bt 14) als auch GE-M 54 und GE-W 37 (Bt 35) finden sich in unmittelbarer Nähe zum Stamm Neudoerfl. Bei der Stammbaumberechnung anhand der Aminosäuresequenzen (Abb. 34B) wird das Isolat HT-N 682 den Stämmen AS33 und K23 zugeordnet (Bt 35). Für die Proben aus Gengenbach und Hagnau ergeben sich hingegen dieselben Beziehungen wie im Nukleotid-Stammbaum.

Abb. 34 FSME-Virus-Stammbaum anhand von **NS2a-Gen-Sequenzen**. Die Berechnung mittels Neighbour Joining wurde sowohl auf Nukleotid- (A) als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene (B) durchgeführt. Die FSME-Virus-Isolate aus den Gebieten Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645), Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) und Hödinger Tobel (HT-N 682) sind rot hervorgehoben. Die GenBank-accession numbers der Virusstämmen sind im Anhang aufgeführt. Die Stammbäume wurden mit dem Omsk Hämorrhagischen Fiebertypus (OHF) als Außengruppe gewurzelt. An den Knotenpunkten sind Bootstrap-Werte, berechnet anhand von 100 Wiederholungen, angegeben.

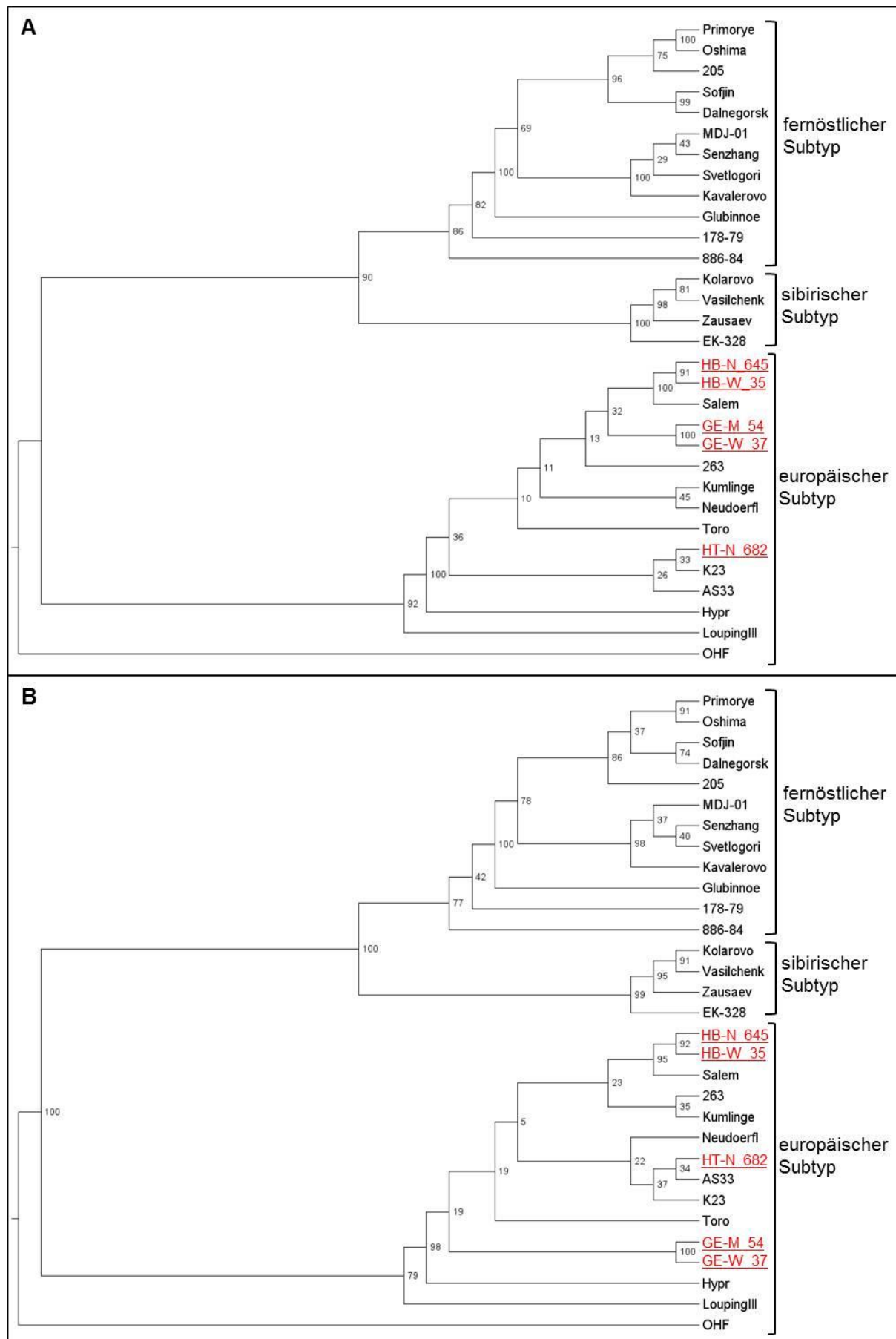


3.3.5.2 Stammbaumberechnung mit Maximum Parsimony

Die mit Hilfe der Maximum Parsimony-Methode berechneten Stammbäume sind in Abb. 35 und Abb. 36 dargestellt. Auch in diesen Bäumen wird die Zuordnung der FSME-Virus-Stämme zum fernöstlichen, sibirischen und europäischen Subtyp deutlich. Diese grobe Einteilung sowie die Verhältnisse innerhalb des fernöstlichen und sibirischen Subtyps sind wiederum für alle vier Stammbäume identisch. Auch die Position des Louping ill-Virus stimmt in allen Stammbäumen überein (Bt 76-100).

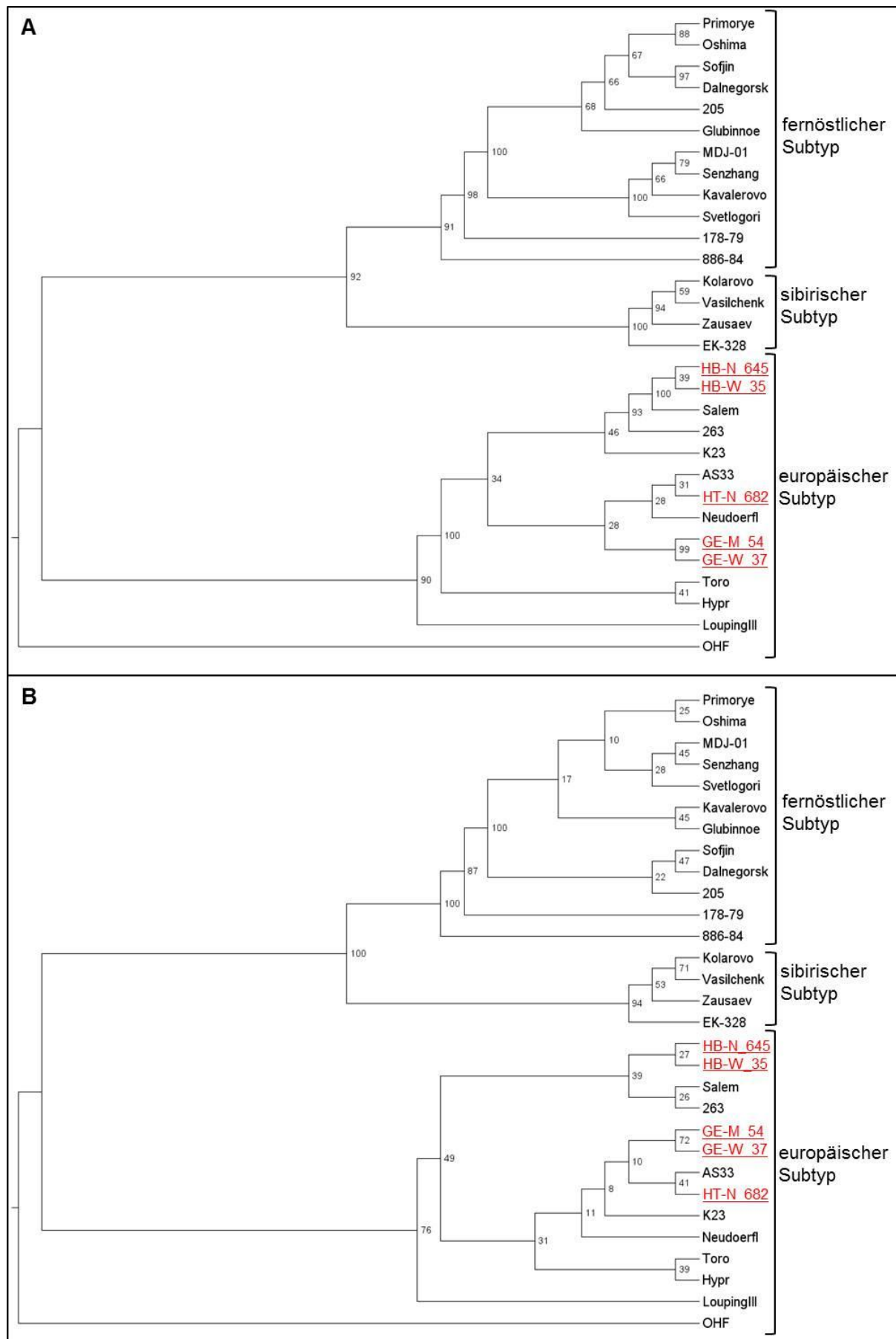
Wird der **E-Gen-Stammbaum** auf Basis der Nukleotidsequenzen berechnet (Abb. 35A), so bilden die Isolate HB-W 35 und HB-N 645 eine Gruppe mit dem Virusstamm Salem (Bt 100); die Proben GE-M 54 und GE-W 37 stellen hierzu eine Schwestergruppe dar (Bt 32). Das Virus-Isolat HT-N 682 wird mit den Stämmen AS33 und K23 in ein gemeinsames Cluster gestellt (Bt 26). Auch im Stammbaum auf Basis der Aminosäuren (Abb. 35B) stehen die Isolate HB-W 35 und HB-N 645 in einem Cluster mit dem Virusstamm Salem (Bt 95), während HT-N 682 eine Gruppe mit den Stämmen AS33 und K23 bildet (Bt 37). Die beiden Proben GE-M 54 und GE-W 37 werden hingegen als eigenes Cluster dargestellt (Bt 19).

Abb. 35: FSME-Virus-Stammbaum anhand von **E-Gen-Sequenzen**. Die Berechnung mittels Maximum Parsimony wurde sowohl auf Nukleotid- (A) als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene (B) durchgeführt. Die FSME-Virus-Isolate aus den Gebieten Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645), Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) und Hödinger Tobel (HT-N 682) sind rot hervorgehoben. Die GenBank-accession numbers der Virusstämme sind im Anhang aufgeführt. Die Stammbäume wurden mit dem Omsk Hämorrhagischen Fiebertypus Virus (OHF) als Außengruppe gewurzelt. An den Knotenpunkten sind Bootstrap-Werte, berechnet anhand von 100 Wiederholungen, angegeben.



Im **NS2a-Gen-Stammbaum** auf Basis der Nukleotidsequenzen (Abb. 36A) bilden die Virusstämme AS33 und Neudoerfl ein gemeinsames Cluster mit dem Isolat HT-N 682 (Bt 28). Die Isolate GE-W 37 und GE-M 54 bilden eine Schwestergruppe zum AS33/Neudoerfl-Cluster (Bt 28). Die beiden Isolate HB-W 35 und HB-N 645 werden auch in diesem Baum zum Stamm Salem gestellt (Bt 100). Bei der Berechnung des Stammbaums anhand der Aminosäuresequenzen (Abb. 36B) bilden die Proben HB-N 645 und HB-W 35 eine Schwestergruppe zu den Stämmen Salem und 263 (Bt 39). Das Isolat HT-N 682 wird mit dem Stamm AS 33 gruppiert (Bt 41). Die Isolate GE-M 54 und GE-W 37 bilden hierzu eine Schwestergruppe (Bt 10).

Abb. 36: FSME-Virus-Stammbaum anhand von **NS2a-Gen-Sequenzen**. Die Berechnung mittels Maximum Parsimony wurde sowohl auf Nukleotid- (A) als auch auf Aminosäuresequenz-Ebene (B) durchgeführt. Die FSME-Virus-Isolate aus den Gebieten Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645), Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) und Hödinger Tobel (HT-N 682) sind rot hervorgehoben. Die GenBank-accession numbers der Virusstämme sind im Anhang aufgeführt. Die Stammbäume wurden mit dem Omsk Hämorrhagischen Fiebertypus (OHF) als Außengruppe gewurzelt. An den Knotenpunkten sind Bootstrap-Werte, berechnet anhand von 100 Wiederholungen, angegeben.



3.3.6 Epidemiologische Daten

Insgesamt wurden 7842 *I. ricinus* aus 11 Untersuchungsgebieten in Süddeutschland molekularbiologisch auf FSME-Viren untersucht; in vier Gebieten wurden infizierte Zecken nachgewiesen (Tab. 25).

Im Untersuchungsgebiet Hödinger Tobel im Bodenseekreis war eine von 1131 Zecken positiv, was einer Prävalenz von 0,09% entspricht. In Hagnau am Bodensee betrug die Prävalenz 0,17%, hier waren 2 von 1167 Zecken infiziert. Fasst man beide Untersuchungsgebiete aus dem Bodenseekreis zusammen, so ergibt sich eine Prävalenz von 0,13% (3/2298 positiv).

In Stuttgart-Botnang wurden in einer von 795 Zecken FSME-Viren nachgewiesen (Prävalenz: 0,13%).

Die höchste Befallsrate (0,66%) wurde in Gengenbach im Ortenaukreis festgestellt; hier waren 2 von 304 *I. ricinus* mit FSME-Viren infiziert.

Hingegen wurden in den Gebieten Bodanrück, Großbottwar, Pulverdinger Holz, Hausach (Ortsteile Hausach, Hechtsberg, Gechbach) und Oberprechtal keine mit FSME-Viren infizierten Zecken detektiert.

Tab. 25: Prävalenz von FSME-Viren in *I. ricinus* in vier Untersuchungsgebieten in Baden-Württemberg.

Untersuchungsgebiet	Land-/ Stadtkreis	untersucht/positiv (%)	positive Stadien
Hödinger Tobel	Bodenseekreis	1131/1 (0,09%)	1 Nymphe
Hagnau am Bodensee	Bodenseekreis	1167/2 (0,17%)	1 Nymphe, 1 Weibchen
Stuttgart-Botnang	Stuttgart	795/1 (0,13%)	1 Weibchen
Gengenbach	Ortenaukreis	304/2 (0,66%)	1 Weibchen, 1 Männchen

In Abb. 37 ist die geographische Lage der FSME-Virus-Fundorte in Baden-Württemberg dargestellt.

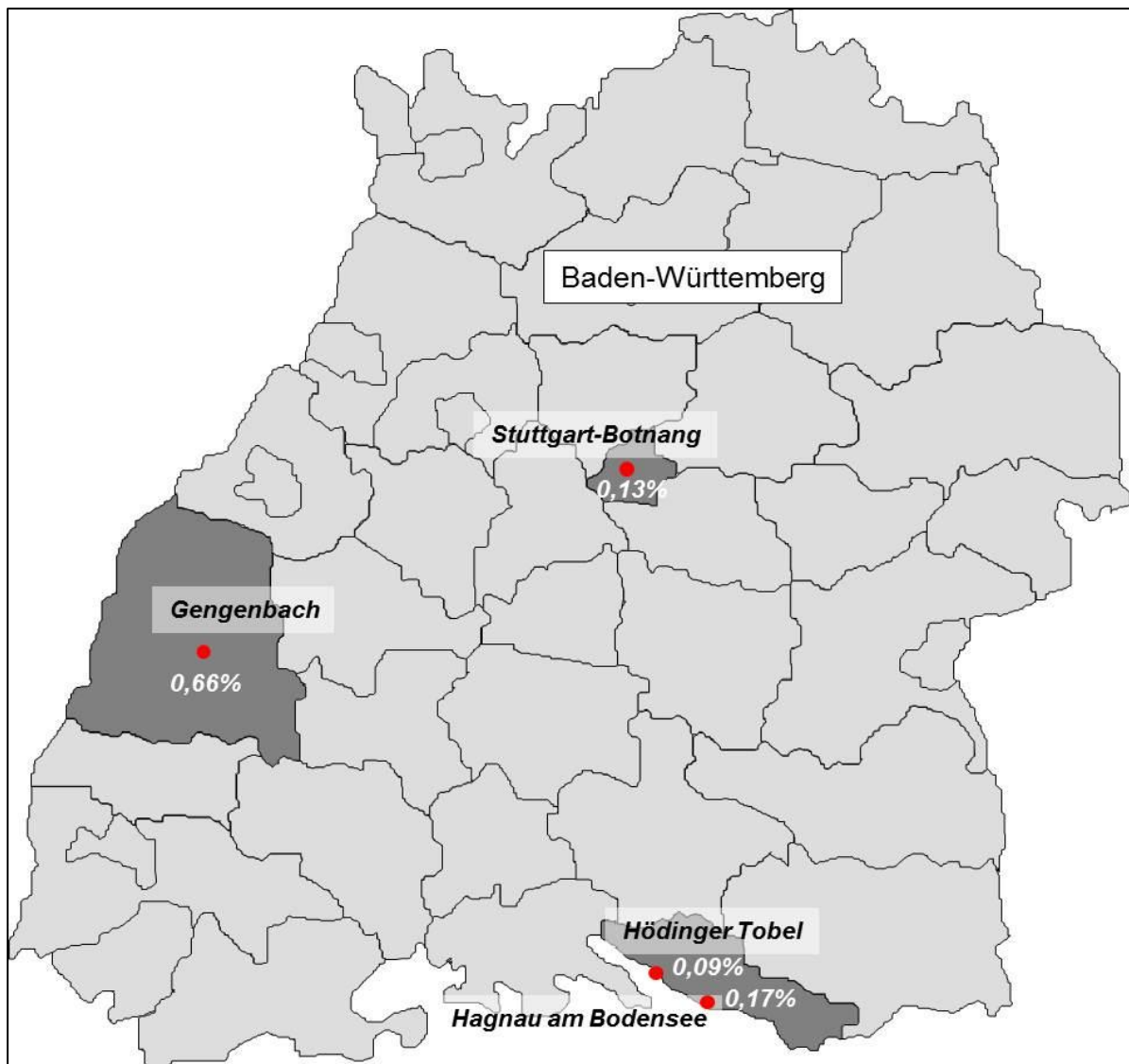


Abb. 37: Prävalenz von FSME-Viren in *I. ricinus* in Baden-Württemberg.

3.4 HANTAVIREN

3.4.1 Untersuchung von Nagern auf Puumala-Virus-Infektionen

Im Jahr 2007 wurde in Deutschland eine ungewöhnlich hohe Zahl an Infektionen mit Hantaviren des Typs Puumala registriert; insbesondere von der Schwäbischen Alb, die als Hochendemiegebiet gilt, wurden zahlreiche Erkrankungen gemeldet.

Um zu überprüfen, ob sich die hohen Infektionszahlen im Jahr 2007 in einer hohen Virusprävalenz der Reservoirwirte widerspiegeln, wurden Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) und andere Nager aus Untersuchungsgebieten auf der Schwäbischen Alb auf Puumala-Virus-Infektionen untersucht.

3.4.1.1 Untersuchungsmaterial

Die Untersuchungsgebiete auf der Schwäbischen Alb lagen in den Landkreisen Reutlingen (Gemeinde Römerstein: Böhringen, Donnstetten, Zainingen) und Alb-Donau (Westerheim). Insgesamt wurden in diesen vier Gebieten 104 Nager (57 Rötelmäuse, 47 Vertreter anderer Nagerarten) sowie 15 Insectivora (*Sorex* spp.) gefangen.

Tab. 26 gibt einen Überblick über die Zahl der in jedem Gebiet untersuchten Nager.

Tab. 26: Übersicht über die Untersuchungsgebiete auf der Schwäbischen Alb sowie die Zahl und Art der jeweils gefangenen Nager bzw. Insectivora. Böhringen, Donnstetten, Zainingen: Gemeinde Römerstein, Landkreis Reutlingen; Westerheim: Gemeinde Westerheim, Landkreis Alb-Donau

	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Microtus arvalis</i>	<i>Apodemus</i> spp.	<i>Sorex</i> spp.	gesamt
Böhringen	36	4	17	8	65
Donnstetten	8	5	8	6	27
Zainingen	11	0	2	1	14
Westerheim	2	2	9	0	13
gesamt	57	11	36	15	119

3.4.1.2 Molekularbiologischer Nachweis von Puumala-Viren

Zum molekularbiologischen Nachweis von Puumala-Viren in Nagern wurden Lungengewebeproben mit Hilfe einer RT-nested-PCR des S-Segments (Essbauer et al., 2006) untersucht. Mit Hilfe der ersten PCR wurde ein 760bp langes Fragment des S-Segments amplifiziert; das Amplifikationsprodukt der nested-PCR wies eine Länge von 331bp auf.

Insgesamt erwiesen sich in dieser PCR 33 von 57 *M. glareolus* als positiv (siehe Tab. 27). Für 26 Proben waren bereits nach der ersten PCR Amplifikate detektierbar; sieben weitere Proben zeigten erst in der nested-PCR positive Ergebnisse.

In keinem der 47 übrigen Nager (*Microtus arvalis* und *Apodemus* spp.) und 15 Insectivora (*Sorex* spp.) wurden Puumala-Viren nachgewiesen.

3.4.1.3 Serologischer Nachweis von Antikörpern gegen Hantaviren

Neben der molekularbiologischen Untersuchung der Lungengewebeproben wurden Brustraum-Transsudate der Nager serologisch mit Hilfe eines spezifischen ELISA auf Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe untersucht. Transsudate von *Apodemus* spp. wurden zusätzlich mit einem weiteren ELISA auf Antikörper gegen Vertreter der Hantaan-Gruppe getestet.

Insgesamt wurden in 20 von 57 Transsudaten von Rötelmäusen Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe detektiert. Dagegen erwiesen sich die Transsudate aller Vertreter anderer Nager- bzw. Insectivora-Arten als negativ (siehe Tab. 27).

In keiner der 36 *Apodemus* spp. wurden mittels ELISA Antikörper gegen Viren der Hantaan-Gruppe nachgewiesen.

3.4.1.4 Vergleich der molekularbiologischen und serologischen Untersuchungsergebnisse

Insgesamt wurden 104 Nager und 15 Insectivora (*Sorex* spp.) auf Puumala-Virus-Infektionen untersucht; Infektionen wurden lediglich in Rötelmäusen nachgewiesen. Tab. 27 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der molekularbiologischen und serologischen Untersuchung von Nagern und Insectivora auf Puumala-Viren bzw. Hantavirus-Antikörper.

Tab. 27: Vergleich der Ergebnisse der molekularbiologischen und serologischen Untersuchung von Nagern und Insectivora auf Puumala-Viren bzw. Hantavirus-Antikörper.

	untersucht	Puumala-Virus-PCR positiv	ELISA-positiv	
			Puumala-Gruppe	Hantaan-Gruppe
<i>Myodes glareolus</i>	57	33	20	---
<i>Microtus arvalis</i>	11	0	0	---
<i>Apodemus</i> spp.	36	0	0	0
<i>Sorex</i> spp.	15	0	0	---

Während in der Puumala-spezifischen PCR 33 Rötelmäuse positiv getestet wurden (57,9%), wurden mittels ELISA in lediglich 20 Tieren IgG-Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe nachgewiesen (35,1%). Alle im ELISA positiv getesteten Tiere zeigten auch positive PCR-Ergebnisse. Im Gegensatz dazu waren 13 Tiere in der PCR Puumala-Virus-positiv, wiesen jedoch im ELISA keine Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe auf (Abb. 38).

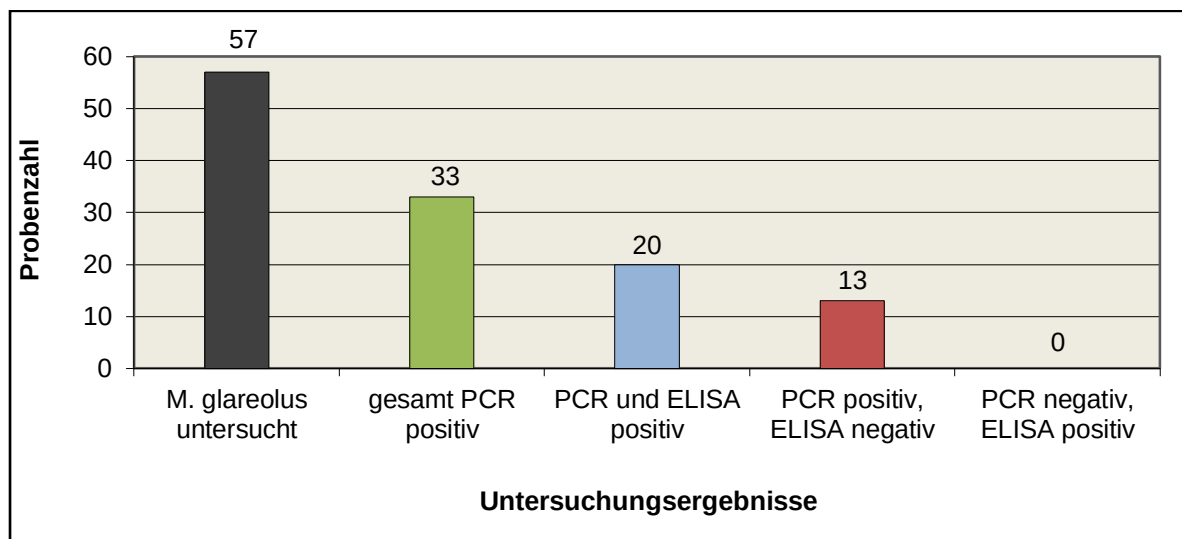


Abb. 38: Vergleich der Ergebnisse der molekularbiologischen und serologischen Untersuchung von Rötelmäusen auf Puumala-Viren bzw. Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe.

3.4.1.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Zur genaueren Charakterisierung der in Rötelmäusen detektierten Puumala-Viren wurden die Amplifikationsprodukte der S-Segment-PCR sequenziert und untereinander sowie mit Daten der Gendatenbank verglichen.

Für 26 Proben standen Amplifikate der ersten PCR zur Verfügung, für sieben weitere Proben diejenigen der nested-PCR. In jedem Fall wurde die Sequenzierung sowohl mit dem forward- als auch mit dem reverse-Primer durchgeführt und die jeweiligen Teilsequenzen anschließend zusammengefügt. Auf diese Weise wurden Sequenzen mit einer Länge von 414-671bp (Amplifikate der ersten PCR) bzw. 290-297bp (nested-PCR-Amplifikate) gewonnen. Da zwei der sieben nested-PCR-Amplifikate keine verwertbaren Sequenzen lieferten, standen insgesamt 31 S-Segment-Sequenzen für die anschließenden Vergleiche zur Verfügung.

Mit Hilfe des Programms BioEdit wurde ein multiples Alignment aller Sequenzen erstellt. Dabei zeigten sich fünf Sequenzvarianten (im Folgenden als R1-R5 bezeichnet), die sich in 1-8 Nukleotiden unterschieden (Tab. 28) und mit unterschiedlicher Häufigkeit vertreten waren. Die Sequenzvarianten R1 und R2 wurden in 12 bzw. 15 Rötelmäusen nachgewiesen und waren somit am häufigsten. Sequenz R3 tauchte in zwei Tieren auf, die beiden Varianten R4 und R5 hingegen wurden jeweils nur ein einziges Mal detektiert.

Die Varianten R1 bis R3 wurden jeweils in mehreren Untersuchungsgebieten nachgewiesen; es ließ sich somit keine geographische Clusterbildung der unterschiedlichen Sequenzen erkennen.

Neben den Nukleotidsequenzen wurden auch die aus diesen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Varianten R1-R5 verglichen. Hierzu wurden mit Hilfe von BioEdit die Aminosäuresequenzen berechnet und ein multiples Sequenzalignment erstellt; dieses wies eine Länge von 146 Aminosäuren auf.

Im Gegensatz zu den sich unterscheidenden Nukleotidsequenzen waren die Aminosäuresequenzen R1-R5 identisch (Tab. 28, Abb. 40).

Tab. 28: Vergleich der aus Rötelmäusen gewonnenen Varianten der S-Segment-Sequenzen des Puumala-Virus. Dargestellt sind die Unterschiede der Nukleotid- (weiß hinterlegt) sowie der Aminosäuresequenzen (grau hinterlegt). aa: Aminosäuren; nt: Nukleotide.

	R1	R2	R3	R4	R5
R1		8 nt	4 nt	3 nt	3 nt
R2	0 aa		8 nt	7 nt	7 nt
R3	0 aa	0 aa		1 nt	3 nt
R4	0 aa	0 aa	0 aa		2 nt
R5	0 aa	0 aa	0 aa	0 aa	

Die S-Segment-Nukleotidsequenzen aus den Rötelmäusen wurden mittels BLAST mit Daten der Gendatenbank GenBank (NCBI) abgeglichen. Die Sequenzen R1-R5 zeigten Übereinstimmungen von 97-99% mit in der Datenbank hinterlegten Puumala-Virus-Sequenzen aus Süddeutschland (Landkreise Böblingen und Alb-Donau sowie Stadtkreis Stuttgart). Die Ergebnisse des BLAST-Abgleichs sind in Tab. 29 dargestellt.

Tab. 29: BLAST-Abgleich der S-Segment-Sequenzen aus Rötelmäusen mit Daten der Gendatenbank. Für jede Sequenzvariante (R1-R5) ist der Datenbankeintrag mit der höchsten prozentualen Übereinstimmung und den geringsten Nukleotidunterschieden angegeben. Zudem ist die Herkunft der jeweiligen Datenbanksequenz angegeben. nt = Nukleotide; LK = Landkreis, SK = Stadtkreis.

	Datenbankeintrag			
	accession no.	Herkunft	Übereinstimmung	Unterschiede
R1	EU085566	Renningen (LK Böblingen)	98%	11nt
R2	EU085565	Renningen (LK Böblingen)	97%	14nt
R3	EU266758	Stuttgart (SK Stuttgart)	99%	3nt
R4	EU266758	Stuttgart (SK Stuttgart)	99%	2nt
R5	EU266757	Westerstetten (LK Alb-Donau)	99%	3nt

3.4.1.6 Epidemiologische Daten

Insgesamt wurden in 33 von 57 Rötelmäusen Puumala-Viren nachgewiesen, was einer Gesamtprävalenz von 57,9% entspricht (Tab. 30).

In allen vier Untersuchungsgebieten zeigten sich mit Puumala-Viren infizierte Tiere; die Prävalenzen unterschieden sich jedoch deutlich zwischen den einzelnen Gebieten.

Die größte Zahl an positiven Tieren wurde im Gebiet Böhringen festgestellt; hier waren 28 von 36 *M. glareolus* mit Puumala-Viren infiziert (77,8%).

In den Gebieten Donnstetten und Zainingen wurden jeweils zwei Puumala-Virus-infizierte Rötelmäuse detektiert, was einer Prävalenz von 25% bzw. 18,2% entspricht. Aus dem Gebiet Westerheim wurden lediglich zwei Rötelmäuse untersucht; in einem der Tiere wurde eine Puumala-Infektion nachgewiesen.

Tab. 30: Prävalenz von Puumala-Viren in Rötelmäusen auf der Schwäbischen Alb. Dargestellt sind die mittels PCR erhaltenen Ergebnisse.

Untersuchungsgebiet	Gemeinde	Landkreis	untersucht/positiv	Prävalenz
Böhringen	Römerstein	Reutlingen	36/28	77,8%
Donnstetten	Römerstein	Reutlingen	8/2	25%
Zainingen	Römerstein	Reutlingen	11/2	18,2%
Westerheim	Westerheim	Alb-Donau	2/1	„50%“
gesamt			57/33	57,9%

3.4.2 Untersuchung von Humanseren auf Puumala-Viren

Um zu überprüfen, inwieweit sich Puumala-Viren molekularbiologisch im Blut von erkrankten Personen detektieren lassen, wurden Humanseren aus dem Jahr 2007, die im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg in der Routinediagnostik auf Puumala-Virus-Antikörper getestet worden waren, mittels PCR untersucht.

3.4.2.1 Molekularbiologische Untersuchung mittels PCR

Insgesamt wurden 234 Seren molekularbiologisch getestet. Von diesen zeigten im zuvor durchgeführten Puumala-Virus-ELISA 78 positive und 156 negative Reaktionen.

In 30 Seren wurden mit Hilfe der RT-nested-PCR des S-Segments nach Essbauer et al. (2006) Puumala-Viren nachgewiesen; in allen Fällen zeigten sich erst in der nested-PCR positive Ergebnisse.

Von den PCR-positiven Proben wiesen 25 im ELISA sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper auf, in drei weiteren Proben wurden IgM-Antikörper detektiert. Daneben wurden in zwei Proben, in denen mittels ELISA keinerlei Antikörper nachgewiesen werden konnten, mit Hilfe der PCR Puumala-Viren detektiert (Abb. 39).

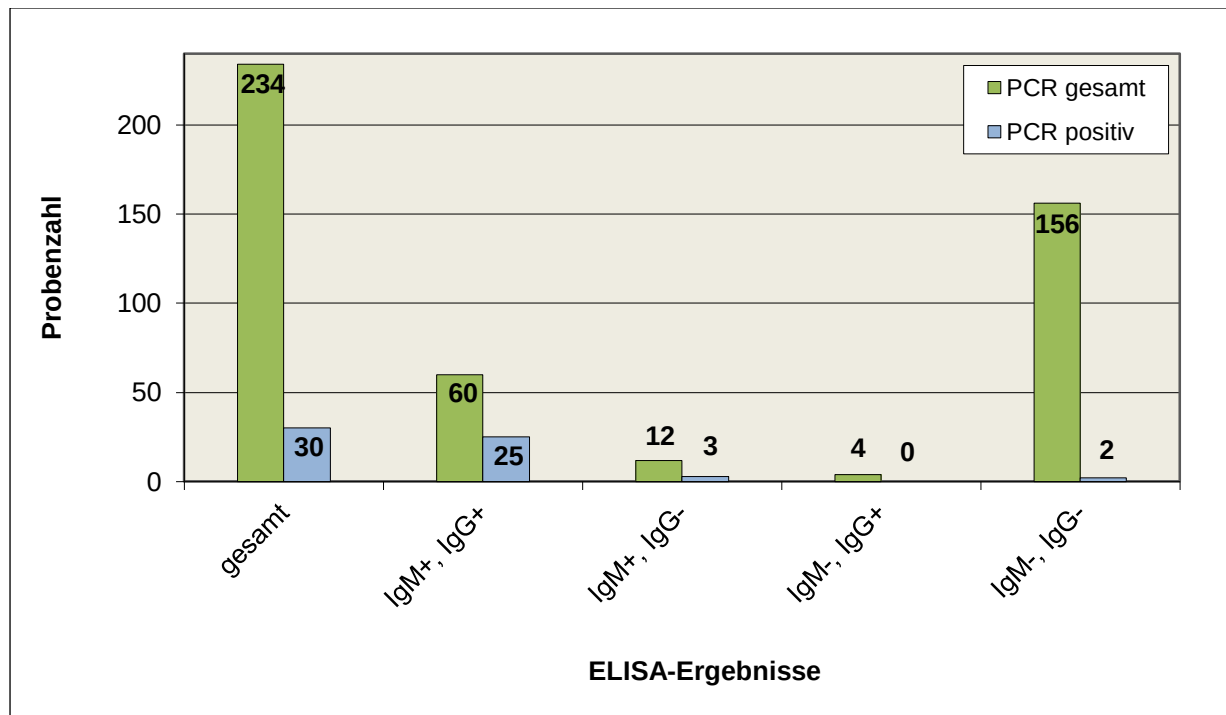


Abb. 39: Untersuchung von Humanseren auf Puumala-Viren mittels RT-nested-PCR des S-Segments.

3.4.2.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die in den Humanseren detektierten Puumala-Viren genauer zu charakterisieren, wurden die nested-PCR-Amplifikate der S-Segment-PCR sequenziert. Da die Amplifikate mit 331bp eine sehr geringe Länge aufwiesen, wurde für die Sequenzierung lediglich der forward-Primer der nested-PCR verwendet. Auf diese Weise wurden für 27 Amplifikate Sequenzen gewonnen, die nach manueller Korrektur Längen zwischen 279bp und 300bp aufwiesen. Die Amplifikate der übrigen drei Proben lieferten keine verwertbaren Sequenzen.

Um die S-Segment-Sequenzen miteinander zu vergleichen, wurde mit Hilfe des Programms BioEdit ein multiples Sequenzalignment erstellt, das nach einheitlicher Kürzung aller Sequenzen eine Länge von 276bp aufwies. Die Sequenzen, die im Folgenden als P1-P16 bezeichnet werden, unterschieden sich untereinander in 1 bis 16 Nukleotiden. Einige Sequenzvarianten tauchten mehrfach auf: die Sequenz P1 war fünfmal vertreten, P2 und P3 jeweils viermal, P4 zweimal. Die Varianten P5 bis P16 wurden jeweils nur einmal detektiert.

Der Abgleich der S-Segment-Sequenzen P1 bis P16 mit Daten der Gendatenbank mit Hilfe von BLAST ergab Übereinstimmungen von 96% bis 100% mit anderen Puumala-Virus-Sequenzen aus Süddeutschland.

Die Puumala-Virus-Nukleotidsequenzen aus den Humanseren unterschieden sich von den in Rötelmäusen aus Römerstein detektierten Sequenzen in bis zu 18 Nukleotiden.

Mit Hilfe des Programms BioEdit wurden die S-Segment-Nukleotidsequenzen in Aminosäuresequenzen umgewandelt; das zugehörige Alignment wies eine Länge von 91 Aminosäuren auf. Die Sequenzen von 26 der 27 Proben waren identisch. Lediglich die Sequenz P7 unterschied sich in einer einzigen Aminosäure von den übrigen Sequenzen: hier zeigte sich an Position 29 des Alignments die Aminosäure Alanin (A) anstelle von Glycin (G) (Abb. 40).

Abgesehen von der Sequenz P7 stimmten die Aminosäuresequenzen der Puumala-Viren aus Humanseren mit denen aus *M. glareolus* zu 100% überein (Abb. 40).

Abb. 40: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der in Rötelmäusen (R1-R5) und Humanseren (P1-P16) detektierten Puumala-Viren im Einbuchstabencode. Identische Aminosäuren werden durch Punkte repräsentiert, abweichende Aminosäuren sind blau dargestellt. Die Aminosäuresequenzen wurden mit Hilfe von BioEdit aus den Nukleotidsequenzen der S-Segment-Amplifikate abgeleitet; das Alignment wurde mit Hilfe des Programms MultAlign (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) berechnet.

Die Humanseren stammten aus den Landkreisen Böblingen (14 Seren), Calw (6), Esslingen (2) und Reutlingen (1) sowie dem Stadtkreis Stuttgart (1). Alle fünf Sequenzen der Variante P1 stammten aus dem Landkreis Böblingen, die beiden als P4 bezeichneten Sequenzen wurden im Landkreis Esslingen detektiert. Hingegen wurden die Sequenzen der Varianten P2 und P3 (jeweils drei Sequenzen) in mehreren Landkreisen nachgewiesen (Tab. 31). Für drei Seren war die Herkunft nicht bekannt.

Aufgrund der ungenauen Angaben zur Herkunft der einzelnen Seren ist eine genaue geographische Zuordnung jedoch nicht möglich, sodass sich über eine eventuelle räumliche Clusterbildung der einzelnen Sequenzen keine Aussage treffen lässt.

Tab. 31: Geographische Zuordnung der in Humanseren detektierten S-Segment-Sequenzen zu Landkreisen Baden-Württembergs. Für jede Sequenzvariante P1-P16 ist die Zahl der Einzelsequenzen angegeben, die in den jeweiligen Landkreisen detektiert wurde. LK: Landkreis, SK: Stadtkreis.

	LK Böblingen	LK Calw	LK Esslingen	LK Reutlingen	SK Stuttgart	unbekannt	gesamt
P1	5						5
P2	1	2				1	4
P3	1	2				1	4
P4			2				2
P5	1						1
P6	1						1
P7	1						1
P8				1			1
P9					1		1
P10	1						1
P11		1					1
P12		1					1
P13	1						1
P14	1						1
P15	1						1
P16						1	1
gesamt	14	6	2	1	1	3	27

3.5 NACHWEIS DER VEKTOREN-DNA

Um auszuschließen, dass negative Ergebnisse in den molekularbiologischen Untersuchungen durch fehlerhafte Nukleinsäure-Extraktion oder durch Hemmung der PCR-Reaktionen zustande kamen, wurde die Vektoren- bzw. Wirtstier-DNA mittels PCR nachgewiesen.

Sowohl für *Dermacentor* spp. als auch für *Ixodes ricinus* wurde stichprobenartig eine Schildzecken-spezifische PCR durchgeführt, bei der ein 220bp großes Fragment der 18S-rDNA amplifiziert wurde. Für Nagerproben wurde stichprobenartig eine PCR durchgeführt, die sowohl *Muridae* als auch *Arvicolidae* erfasste. Die verwendeten Primer amplifizierten ein 248bp großes Fragment der 18S-rDNA.

Bei allen untersuchten Proben zeigten sich im Gel DNA-Stücke der erwarteten Größe (Abb. 41). Daher kann davon ausgegangen werden, dass negative Ergebnisse in den Erreger-spezifischen PCR-Untersuchungen nicht auf fehlerhafte Nukleinsäure-Extraktionen oder PCR-Hemmung zurückzuführen sind.

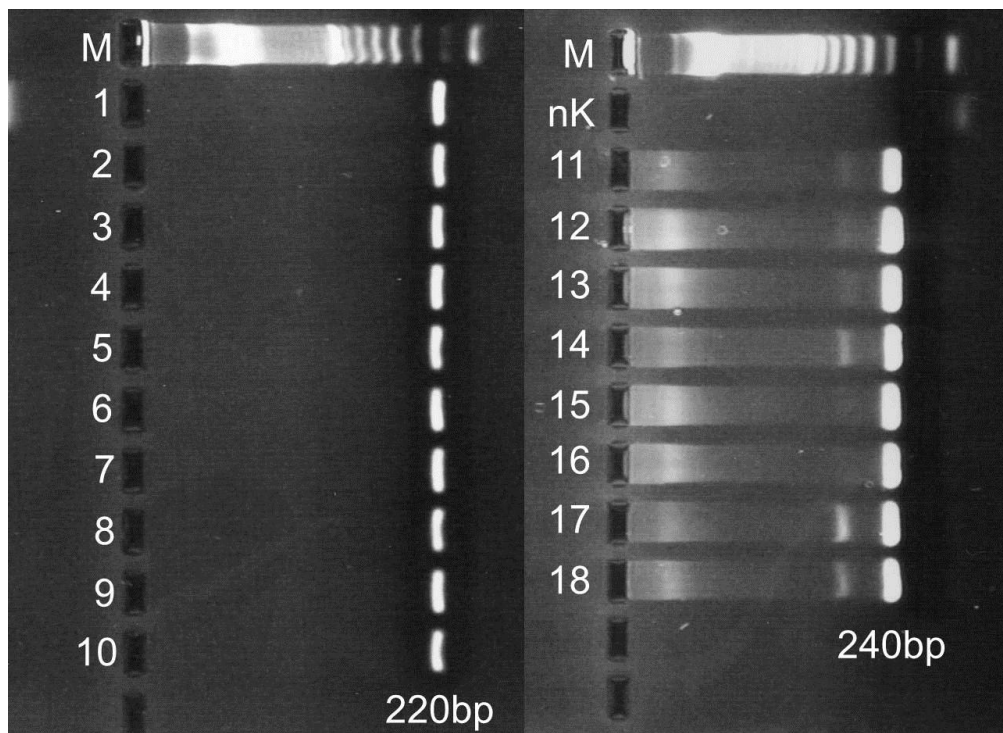


Abb. 41: Ergebnis einer schildzeckenspezifischen (links) und einer nagerspezifischen PCR.

Amplifiziert wurden jeweils Fragmente der 18S-rDNA. M: 100bp-Marker; nK:

Negativkontrolle; 1-10: *Dermacentor* spp.; 11-18: *Microtus arvalis*.

4. Diskussion

4.1 *COXIELLA BURNETII*

4.1.1 Molekularbiologischer Nachweis von *C. burnetii*

Um die Existenz von *C. burnetii* in Naturherden in den untersuchten Gebieten zu überprüfen, wurden Zecken der Gattung *Dermacentor* und Nager molekularbiologisch auf Infektionen mit dem Erreger untersucht.

Mittels der verwendeten PCR der IS1111-Region (Fournier et al., 2003) wurde weder in 1120 *Dermacentor*-Zecken noch in 119 Nagerorgan-Pools *C. burnetii* nachgewiesen.

In einem Vorversuch wurden Organproben von Labormäusen mit *C. burnetii*-Zellkulturüberstand in verschiedenen Konzentrationen versetzt, um die Sensitivität der verwendeten PCR-Methode zu ermitteln. Von diesen „gespikten“ Proben wurden die Nukleinsäuren mit Hilfe des Maxwell extrahiert und die nested-PCR der IS1111-Region durchgeführt. Dabei waren alle Proben bis zu einer Konzentration von 10 Partikeln/µl positiv, in Leber- und Lungenproben konnte sogar eine Konzentration von 1 Partikel/µl noch nachgewiesen werden. Die Sensitivität und somit die Nachweisgrenze der eingesetzten PCR liegt daher bei 1-10 *C. burnetii*-Partikeln/µl. Diese sehr hohe Sensitivität wird durch die Wahl der Zielsequenz ermöglicht. Die IS1111-Region, ein repetitives Element, ist im Genom von *C. burnetii* in 21 Kopien vorhanden (Seshadri et al., 2003), sodass selbst bei einer geringen Zahl an Erregern in einer Probe eine große Menge an template-DNA für die PCR zur Verfügung steht. Durch die Verwendung einer nested-PCR wird die Sensitivität zusätzlich erhöht, da die in der ersten PCR gewonnenen Amplifikate in der zweiten PCR erneut vermehrt werden. Fournier et al. (2003) geben die Sensitivität ihrer PCR bei der Untersuchung von Serum mit 1 *C. burnetii*-Partikel pro µl an; die hier ermittelte Sensitivität liegt somit nur geringfügig niedriger.

Mit Hilfe des Vorversuchs wurde zudem gezeigt, dass die hier verwendete Methodik für den Nachweis von *C. burnetii* in Nagerorganen prinzipiell geeignet ist, d.h. dass die Nukleinsäure-Extraktion mittels Maxwell ausreicht, um alle PCR-Inhibitoren aus der Probe zu entfernen, sodass der DNA-Nachweis mittels PCR möglich ist.

Um falsch-negative Ergebnisse durch fehlerhafte Nukleinsäure-Extraktion oder Inhibition der PCR auszuschließen, wurde stichprobenartig eine Schildzecken- bzw. Nager-spezifische PCR durchgeführt, um die Vektoren- bzw. Wirts-DNA in den Proben nachzuweisen. Diese PCR brachte in allen Fällen positive Ergebnisse. Ebenso zeigt der Nachweis von *Rickettsia* spp. in den *Dermacentor*-Zecken die Eignung des Probenmaterials für Pathogen-Nachweise (siehe Pkt. 3.2.1). Falsch-negative Ergebnisse der Coxiellen-spezifischen PCR aufgrund von Inhibitionen können somit ausgeschlossen werden.

Es existieren keine Angaben darüber, wie hoch die Erregerzahl in mit Coxiellen infizierten Zecken ist. Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Erregerzahl in den Zecken unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegt; falsch-negative Ergebnisse können jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Gleiches gilt auch für die molekularbiologische Untersuchung der Nagerorgan-Proben.

4.1.2 Serologischer Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern

Zusätzlich zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurden Blutproben der Nager serologisch auf Antikörper gegen *C. burnetii* untersucht, um neben akuten auch zurückliegende Infektionen erfassen zu können.

Hierfür wurde zunächst die Komplementbindungsreaktion (KBR) durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, da sie speziesunabhängig ist. Somit konnte die für Humansenen etablierte Methode für die Nagerproben übernommen werden. Im Gegensatz dazu sind für andere serologische Methoden (ELISA, indirekter Immunfluoreszenztest) spezifische sekundäre Antikörper erforderlich.

In ersten Versuchen zeigten die Nagertranssudate positive Ergebnisse sowohl in einigen Probenverdünnungen als auch in den Serumkontrollen, was sich in Wiederholungen des Tests mit denselben Proben bestätigte. Dies deutet auf antikomplementäre Eigenschaften der Nagerproben hin.

In den mitgeführten Serumkontrollen wird kein spezifisches Antigen hinzugegeben. Es dürfte daher keine Bindung der zugegebenen Komplementkomponenten durch Antigen-Antikörper-Komplexe stattfinden, sodass in jedem Fall eine komplette Hämolyse des hämolytischen Systems sichtbar sein muss. Bei Proben mit antikomplementären Eigenschaften werden dagegen die Komplementkomponenten

unspezifisch durch Bestandteile der Proben gebunden, sodass nach Zugabe des hämolytischen Systems keine Hämolyse stattfindet. Die Serumkontrollen erscheinen somit positiv. Daher können solche Proben in der KBR nicht gewertet werden, da sie falsch-positive Ergebnisse zeigen können.

Aufgrund der Tatsache, dass alle zehn zunächst untersuchten Transsudate antikomplementäre Eigenschaften aufwiesen, ist davon auszugehen, dass dieses Probenmaterial für die KBR nicht geeignet ist. Als Ursache für die antikomplementären Eigenschaften der Transsudate kommen bakterielle Kontaminationen in Frage sowie wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Proben.

Da sich die KBR für die Untersuchung der Nagerproben als ungeeignet erwies, wurde für die weiteren serologischen Tests ein ELISA verwendet. Dabei wurde ein für Humansenen entwickelter Kit zum Nachweis von Phase II-IgG-Antikörpern gegen *Coxiella burnetii* mit einem all-species-Konjugat kombiniert.

Die mitgeführten Positivkontrollen, *C. burnetii*-positive Humansenen, zeigten in allen Durchläufen deutlich positive Reaktionen, während die Negativkontrolle (FKS) negativ blieb. Sowohl die Seren als auch die Transsudate der Nager zeigten durchgehend negative Ergebnisse im ELISA, wobei die OD-Werte noch unterhalb des Werts der Negativkontrolle blieben. Mittels ELISA konnten somit keine positiven Proben ermittelt werden.

Bei dem verwendeten all-species-Konjugat handelt es sich um Peroxidase-gekoppeltes Protein G, das unspezifisch an die Fc-Teile von Antikörpern bindet und somit zum Nachweis von Antikörpern verschiedener Säuger-Arten verwendet werden kann. Es wurde als sekundärer Antikörper eingesetzt, da keine artspezifischen Konjugate zur Verfügung standen. Die positiven Ergebnisse der Humansenen zeigen, dass die Kombination der ELISA-Platten und des all-species-Konjugat prinzipiell zum Nachweis von *C. burnetii*-Antikörpern geeignet ist.

Es ist allerdings nicht bekannt, wie hoch die *C. burnetii*-Antikörper-Konzentration im Blut infizierter Nager ist und wie lange sich diese nachweisen lassen. Da kein Serum oder Transsudat eines *C. burnetii*-infizierten Nagers zur Verfügung stand, ließen sich diese Fragen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantworten. Es bleibt daher die Möglichkeit bestehen, dass die negativen Ergebnisse der serologischen Untersuchungen darauf zurückzuführen sind, dass die Antikörperkonzentrationen in Proben von infizierten Nagern unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten

Methode liegen. Dies könnte insbesondere auf die Transsudate zutreffen. Diese wurden durch Spülung des Brustraums der Nager mit 1ml PBS gewonnen. Auf diese Weise ergibt sich ein großer Verdünnungseffekt, sodass die Konzentration von Antikörpern im Transsudat geringer ist als im Serum.

Prinzipiell eignen sich Transsudate trotz dieses Verdünnungseffekts als Untersuchungsmaterial für serologische Untersuchungen. Dies wurde in mehreren Studien bestätigt; beispielsweise wiesen Schex et al. (2010) Rickettsien-Antikörper sowohl in Seren als auch in Transsudaten von Nagern mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT) nach, und Essbauer et al. (2006) detektierten Hantavirus-Antikörper in Transsudaten von Rötelmäusen mittels ELISA. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang ebenfalls der Nachweis von Rickettsien-Antikörpern mittels IIFT (siehe Pkt. 3.2.2.2) sowie von Hantavirus-Antikörpern mittels ELISA (siehe Pkt. 3.4.1.3).

4.1.3 Epidemiologische Daten

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 1120 *Dermacentor*-Zecken sowie 119 Nager aus unterschiedlichen Gebieten Süddeutschlands auf *C. burnetii*-Infektionen untersucht; der Großteil der Zecken stammte aus den Landkreisen Lörrach, Ortenau, Aschaffenburg, Freiburg und Karlsruhe. Ziel dieser Untersuchung war es, zu überprüfen, ob in den Untersuchungsgebieten Naturherde von *C. burnetii* existieren, wie sie in den 1970er Jahren von Liebisch beschrieben wurden (Liebisch, 1977). Er ging davon aus, dass die Erreger in Q-Fieber-Endemiegebieten zwischen Zeckennymphen und Nagern zirkulieren. Die adulten Zecken sollten dann die Bakterien auf größere Haus- und Nutztiere übertragen. Diese scheiden mit Urin, Kot und Geburtsflüssigkeiten die hochinfektösen sporenähnlichen Formen von *C. burnetii* aus, die wiederum die Hauptinfektionsquelle für den Menschen darstellen. Liebisch nahm an, dass Zecken und die mit ihnen verbundenen Naturherde für die Aufrechterhaltung von Q-Fieber-Endemiegebieten notwendig sind.

Die Untersuchungsgebiete, aus denen die *Dermacentor*-Zecken und Nager stammten, lagen in Regionen, in denen in den letzten Jahren sporadische Q-Fieber-Fälle aufgetreten sind (Tab. 32). Das Vorhandensein von *Dermacentor* spp. in diesen Gebieten ließ vermuten, dass hier Naturherde existieren könnten.

Tab. 32: Gemeldete Q-Fieber-Fälle in den Untersuchungsgebieten, 2001-2010 (Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat/>. Datenstand 18.1.2011).

Untersuchungsgebiet	Q-Fieber-Fälle 2001-2010
Landkreis Lörrach	6
Landkreis Ortenau	16
Land- und Stadtkreis Karlsruhe	23
Landkreis Aschaffenburg	17 (2001-2007 und 2009) 89 (Ausbruchsjahr 2008)
Stadtkreis Freiburg	5

Weder bei der molekularbiologischen Untersuchung der *D. marginatus*- und *D. reticulatus*-Zecken noch bei der molekularbiologischen und serologischen Untersuchung der Nager wurden infizierte Tiere in einem der Untersuchungsgebiete gefunden; es gibt somit für keines dieser Gebiete Hinweise auf die Existenz der von Liebisch postulierten Naturherde.

In Kleinostheim im Landkreis Aschaffenburg wurden die Zecken während eines Q-Fieber-Ausbruchs im Frühjahr 2008 gesammelt. Bei diesem Ausbruch erkrankten 37 Personen; als Infektionsquelle wurden Schafe ermittelt (RKI, 2008). Obwohl anzunehmen ist, dass *C. burnetii*-infizierte Zecken sich während eines Q-Fieber-Ausbruchs eher nachweisen lassen, wurden auch in diesem Gebiet keine infizierten Zecken identifiziert.

Bisher gibt es nur sehr wenige Daten über *C. burnetii* in Zecken in Deutschland; für Nager liegen keinerlei frühere Untersuchungen vor.

Im Jahr 2006 wurden 395 *Dermacentor* spp. aus dem Ortenaukreis untersucht; dabei wurden keine infizierten Zecken gefunden (Dezfuli, 2006). In derselben Untersuchung wurden in 435 *I. ricinus* aus verschiedenen Gebieten Baden-Württembergs (Landkreise Lörrach, Ortenau und Main-Spessart) ebenfalls keine *C. burnetii*-Infektionen nachgewiesen (Dezfuli, 2006).

Demgegenüber wiesen Sting et al. (2004) in einer wirtssuchenden *D. marginatus* aus dem Landkreis Lörrach Coxiellen nach. In dieser Untersuchung wurden über 1000 Zecken untersucht, die von Schafen abgesammelt wurden, der Erreger konnte jedoch nur in einer einzigen Zecke identifiziert werden. Interessanterweise gründete Liebisch (1977) seine Theorie über die Zirkulation der Coxiellen in Naturherden auf den Nachweis von zwei *C. burnetii*-infizierten *D. marginatus*, die ebenfalls aus dem

Landkreis Lörrach stammten, sowie von vier infizierten Zecken aus der Nähe von Aschaffenburg, die mittels eines Hämocytentests und Meerschweinchen-Infektionsversuchen identifiziert wurden.

Die Ergebnisse von Sting (2004) und Liebisch (1977) zeigen, dass *Dermacentor* spp. mit Coxiellen infiziert sein können. Allerdings sprechen die sehr geringe Zahl infizierter Zecken, die fast ausschließlich im Landkreis Lörrach gefunden wurden, sowie die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit keine der *Dermacentor* spp. aus Lörrach oder anderen Untersuchungsgebieten positiv getestet wurde, gegen eine weite Verbreitung der Naturherde. Da zudem bei der Untersuchung von Nagern aus den Landkreisen Lörrach und Ortenau ebenfalls keine positiven Tiere identifiziert wurden, kann die Existenz von Naturherden in diesen Gebieten nicht bestätigt werden. Es ist jedoch möglich, dass die Naturherde sehr klein und lokal begrenzt sind und daher nur selten gefunden werden. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse jedoch gegen eine entscheidende Rolle der Naturherde in der Epidemiologie des Q-Fiebers in Deutschland.

Diese Annahme wird unterstützt durch das Auftreten von Q-Fieber-Ausbrüchen in Regionen, in denen *Dermacentor* spp. nicht verbreitet ist. So wurde beispielsweise im Jahr 2003 in Soest (Nordrhein-Westfalen) eine Häufung von 299 Q-Fieber-Fällen beobachtet. Als Infektionsquelle wurde ein *C. burnetii*-infiziertes Schaf ermittelt, das auf einem Bauernmarkt in Soest gelammt hatte und auf diese Weise die Umgebung mit hochinfektiösen sporenähnlichen Körperchen kontaminierte. Alle Q-Fieber-Patienten arbeiteten auf dem Markt oder besuchten diesen, nachdem das Schaf gelammt hatte (Porten et al., 2006). *Dermacentor* spp. ist in diesem Teil Deutschlands nicht verbreitet, sodass dieser Ausbruch nicht mit der Existenz von Naturherden, von denen die Erreger auf Nutztiere übertragen werden, erklärt werden kann. Dies deutet darauf hin, dass Naturherde bzw. *C. burnetii*-infizierte Zecken für das Auftreten von Q-Fieber bei Nutztieren oder Menschen nicht zwingend erforderlich sind.

Die untergeordnete epidemiologische Rolle der *Dermacentor*-Zecken wird zudem deutlich, wenn man das Auftreten von sporadischen Q-Fieber-Fällen in Baden-Württemberg mit der Schafdicke sowie dem bekannten Verbreitungsgebiet von *D. marginatus* vergleicht. Dabei zeigt sich, dass die Zahl der sporadischen Fälle in den Gebieten mit der höchsten Schafdicke am größten ist (Abb. 42), wohingegen sich

keine Korrelation mit der Verbreitung von *D. marginatus* feststellen lässt (Brockmann et al., 2009). Dies verdeutlicht die herausragende Bedeutung der Schafe als Infektionsquelle für den Menschen.

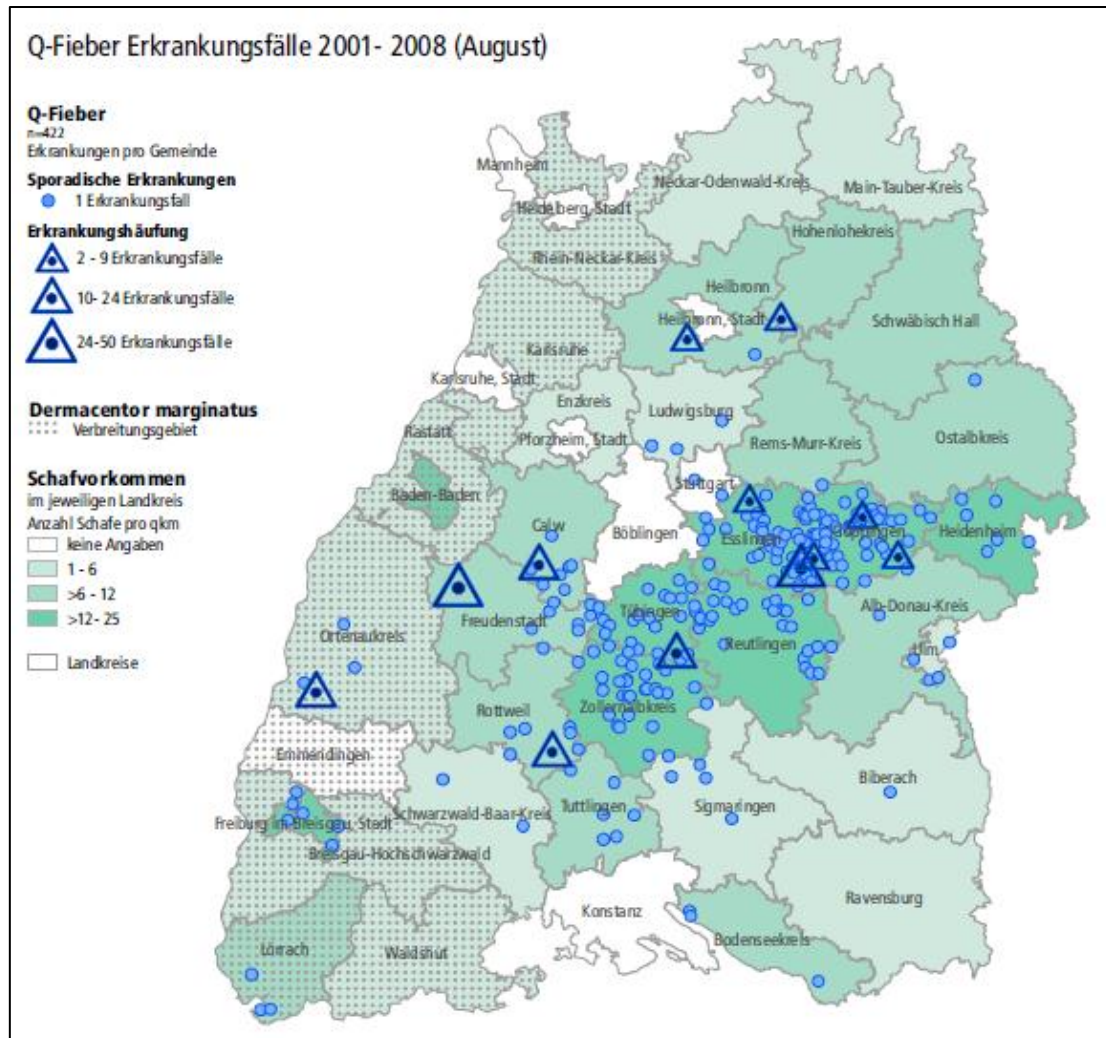


Abb. 42: Q-Fieber-Erkrankungsfälle in Baden-Württemberg 2001-2008 sowie Schafsdichte (grün) und Verbreitung von *D. marginatus* (gepunktete Flächen) in den einzelnen Landkreisen. Sporadische Q-Fieber-Fälle sind als blaue Punkte, Erkrankungshäufungen als blaue Dreiecke dargestellt (Brockmann et al., 2009).

C. burnetii vermehrt sich in Zellen des Mitteldarms von infizierten Zecken; diese scheiden die Erreger in großen Mengen mit dem Kot aus (Maurin und Raoult, 1999). Sting et al. (2004) bestätigten diesen Sachverhalt durch den Nachweis von Coxiellen in einer Zeckenkotprobe, die von einem Schafsvlies stammte. Zecken können somit eine Rolle als „Verstärker“ spielen, da sie erheblich zur Kontamination der Umgebung mit hochinfektösen sporenähnlichen Körperchen beitragen können.

Diese Multiplikator-Funktion ist in der Epidemiologie des Q-Fiebers vermutlich von größerer Bedeutung als die Zirkulation der Bakterien in Naturherden (Dr. Olaf Kahl, pers. Mitteilung).

Auch aus anderen Ländern Europas existieren nur wenige Daten zur Bedeutung von Zecken und Nagern in der Epidemiologie des Q-Fiebers.

In Spanien wurden mehrere Studien durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse zwischen den Untersuchungsgebieten stark unterscheiden. Barandika et al. (2008) stellte im Baskenland in einer einzigen von 109 untersuchten *Haemaphysalis punctata* eine *C. burnetii*-Infektion mittels PCR fest; dagegen wurden weder bei 97 *D. reticulatus* noch bei 288 *I. ricinus* Coxiellen nachgewiesen. Astobiza et al. (2011) untersuchten in derselben Region 340 adulte Zecken verschiedener Arten (*I. ricinus*, *I. hexagonus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*), fanden jedoch keine infizierten Individuen. Barandika et al. (2007) untersuchten zudem Kleinsäuger von Schaffarmen im Baskenland. Dabei wiesen sie in zwei *Mus musculus domesticus* sowie in einer *Apodemus sylvaticus* Infektionen mit *C. burnetii* mittels PCR nach. Die positiven Tiere stammten von einer Farm, auf der es zuvor bei Schafen zu Aborten kam, die möglicherweise durch Q-Fieber-Erkrankungen verursacht worden waren. Die Autoren gehen daher davon aus, dass die Nager die *C. burnetii*-Infektionen durch den Kontakt mit infizierten Schafen oder Schafprodukten (z.B. Nachgeburten) erworben haben. Die Existenz eines Naturherds, der Zecken und Nager involviert, konnte anhand dieser Ergebnisse daher nicht bewiesen werden.

Im Gegensatz zu diesen Studien aus Nordspanien wiesen Toledo et al. (2009) bei Untersuchungen in Zentralspanien zahlreiche *C. burnetii*-Infektionen in Zecken nach. Dabei zeigten sich hohe Prävalenzen bei *Hyalomma lusitanicum* (95/1482, 6,4%) und *D. marginatus* (25/348, 7,2%), wohingegen nur einzelne *Rhipicephalus sanguineus* (2/146, 1,4%) und *Rhipicephalus pusillus* (1/108, 0,9%) infiziert waren.

In Italien wurden auf Sardinien lediglich einzelne *C. burnetii*-Infektionen festgestellt (Satta et al., 2011). Dabei waren 5 von 1045 *Rhipicephalus sanguineus*, 1 von 290 *Rhipicephalus turanicus* sowie 1 von 25 *Haemaphysalis sulcata* infiziert.

In Griechenland (Insel Kephallonia) wiesen Psaroulaki et al. (2006b) in drei *D. marginatus*, zwei *Hyalomma marginatum* und einer *Rhipicephalus turanicus* Infektionen mit *C. burnetii* nach.

Höhere Prävalenzen in Zecken zeigten sich auf Zypern (Psaroulaki et al., 2006a). Hier waren 7% der untersuchten *Rhipicephalus sanguineus* (7/100) sowie 7,3% der *Hyalomma* spp. (3/41) infiziert.

Spitalska und Kocianova (2002) wiesen in einer *I. ricinus* und einer *Haemaphysalis concinna* aus der Slowakei sowie in einer *I. ricinus* und drei *D. marginatus* aus Ungarn *C. burnetii* nach. Insgesamt ergab sich in dieser Untersuchung eine Prävalenz von 2,55% (6/235). Smetanova et al. (2006) identifizierten den Erreger ebenfalls in zwei *I. ricinus* (2/327, 0,8%) sowie in einer *Apodemus flavicollis* mittels PCR.

Untersuchungen aus Großbritannien legen nahe, dass Ratten dort eine größere Rolle in der Q-Fieber-Epidemiologie spielen könnten. Webster et al. (1995) untersuchten Ratten von Schaffarmen und Bauernhöfen serologisch auf Antikörper gegen *C. burnetii*. Dabei wurden je nach Untersuchungsgebiet Prävalenzen von 7% bis 53% ermittelt. An Untersuchungsstellen mit Schafen war die Antikörperprävalenz zwar höher, es wurden jedoch auch an Orten ohne Schafe infizierte Ratten gefunden. Gleichmaßen wiesen McCaughey et al. (2010) in Nordirland bei drei von 31 untersuchten Ratten (9,7%) *C. burnetii*-Infektionen nach. Untersuchungen an Zecken existieren für Großbritannien bisher nicht. Daher lässt sich nicht sagen, ob in den Untersuchungsgebieten Naturherde existieren und von größerer Bedeutung sind.

Insgesamt beschränkt sich die Zahl der *C. burnetii*-infizierten Zecken in den meisten Untersuchungsgebieten auf nur wenige Individuen. Ebenso wurden nur einzelne infizierte Nager gefunden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Bedeutung von Zecken und Nagern auch außerhalb Deutschlands höchstens von marginaler Bedeutung in der Q-Fieber-Epidemiologie ist.

Unklar ist bisher, ob große Wildsäuger oder Vögel bei der Aufrechterhaltung von Q-Fieber-Endemiegebieten und der Übertragung der Infektion auf Nutztiere eine Rolle spielen. Allerdings gibt es nur sehr wenige diesbezügliche Daten; in Deutschland wurden bisher keine entsprechenden Untersuchungen durchgeführt. Im spanischen Baskenland wurden mittels PCR von Lungen- und Leberproben bei einzelnen Säugern und Vögeln Coxiellen nachgewiesen; neben Rehen (4/78), Wildschweinen (4/93) und Hasen (2/22) wurden ein Gänsegeier (1/9) und ein Schwarzmilan (1/7) positiv getestet (Astobiza et al., 2011). Im Südwesten Spaniens wurde zudem in

Rotwild eine Seroprävalenz von 3,64% (5/137) ermittelt (Castillo et al., 2010). In Kanada wurde mit 49% (357/730) eine sehr hohe Antikörperprävalenz bei Hasen festgestellt; weiterhin wurden Antikörper in 16,5% der untersuchten Elche (40/243) nachgewiesen. Hinweise auf zurückliegende *C. burnetii*-Infektionen zeigten sich zudem bei 3 von 42 Waschbären sowie einem von 68 Weißwedelhirschen (Marrie et al., 1993). Die Rolle von Wildtieren in der Q-Fieber-Epidemiologie ist bisher nicht geklärt. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Kontamination der Umwelt mit hochinfektösen sporenähnlichen Körperchen durch die Ausscheidungen infizierter Tiere zu aerogenen Infektionen von Nutztieren führen kann. Dies ist insbesondere in solchen Bereichen denkbar, in denen sich die Lebensräume der Wild- und Nutztiere überschneiden, beispielsweise an Schafweiden, die an Wälder grenzen. Eine Rolle von Zecken bei der Infektion von Wildtieren kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, erscheint aufgrund der meist niedrigen Infektionszahlen jedoch unwahrscheinlich. In den wenigen bisherigen Studien ist die Zahl der infizierten Wildtiere nur sehr gering; es kann daher nicht beurteilt werden, ob Wildtieren tatsächlich eine entscheidende Rolle in der Q-Fieber-Epidemiologie zukommen könnte.

Infizierte Schafe, aber auch Ziegen und Rinder, die *C. burnetii* ausscheiden, stellen die Hauptinfektionsquelle für den Menschen dar. Es existieren jedoch kaum Daten zur Prävalenz von *C. burnetii*-Antikörpern und damit zur Häufigkeit von Q-Fieber-Infektionen bei Nutztieren. Hellenbrand et al. (2001) geben einen Überblick über entsprechende Untersuchungen bei Rindern und Schafen in Deutschland. Je nach Studie wurden Antikörper bei 0,5% bis 13,4% der Rinder und bis zu 4,5% der Schafe festgestellt. Wurden hingegen Schafherden untersucht, die als Infektionsquelle für humane Q-Fieber-Ausbrüche ermittelt wurden, zeigten sich deutlich höhere Seroprävalenzen von 7,9% bis über 50%. In anderen europäischen Ländern wurden bei Schafen Prävalenzen von 4,1% in Spanien, 12,3% in Nordirland, 18,9% auf Zypern und 20% in der Türkei festgestellt (Garcia-Perez et al., 2009; McCaughey et al., 2010; Psaroulaki et al., 2006a; Kennerman et al., 2010). In Nordirland zeigten sich bei Ziegen (9,3%) und Rindern (6,1%) ähnliche Seroprävalenzen wie bei den Schafen (McCaughey et al., 2010), während auf Zypern sowohl bei Ziegen (48,2%) als auch bei Rindern (24%) ungewöhnlich häufig *C. burnetii*-Antikörper nachgewiesen wurden (Psaroulaki et al., 2006a; Kennerman et al., 2010). Da die

serologischen Untersuchungsmethoden in den einzelnen Studien stark variieren, sind die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar; Seroprävalenzen zwischen 5% und 15% scheinen jedoch in Nutztierherden häufig vorzuherrschen, während im Fall eines Q-Fieber-Ausbruchs die Mehrzahl der Individuen einer Herde Infektionen aufweisen kann.

Für die Bekämpfung und Prävention von Q-Fieber-Ausbrüchen, die auf infizierte Schafe zurückgehen, gibt es grundsätzlich zwei Möglichkeiten. Die Behandlung von Schafherden mit Akariziden dient der Reduktion von Zeckenstichen, wodurch eine eventuelle Übertragung von Coxiellen verhindert wird. Wie jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahelegen, spielen Zecken als Überträger des Q-Fiebers keine entscheidende epidemiologische Rolle. Eine Impfung von Schafen gegen *C. burnetii* scheint somit eine erfolgversprechendere Maßnahme zur Prävention von Q-Fieber-Ausbrüchen zu sein.

Weitere Untersuchungen zur Epidemiologie des Q-Fiebers, insbesondere auch zur Rolle von Wildtieren, sind notwendig, um Q-Fieber-Ausbrüche in Zukunft effektiv verhindern zu können.

4.1.4 Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie des Q-Fiebers

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass Zecken in der Epidemiologie des Q-Fiebers in Deutschland keine entscheidende Rolle spielen. Der Einfluss, den die prognostizierte Klimaveränderung auf die Verbreitung von *Dermacentor* spp. hat (siehe Pkt. 4.2.5), ist daher für die Q-Fieber-Epidemiologie unerheblich.

Klimaveränderungen können jedoch, bedingt durch den aerogenen Infektionsweg, direkte Auswirkungen auf die Verbreitung und Häufigkeit von Q-Fieber-Fällen haben. Die sporenähnlichen Körperchen von *C. burnetii*, die für die meisten humanen Infektionen verantwortlich sind, sind sehr resistent gegenüber Umwelteinflüssen wie Austrocknung oder UV-Strahlung. Die Austrocknung begünstigt die Verbreitung der infektiösen Stadien sogar, da sie deren Ausbreitung mit dem Wind ermöglicht. Die veränderten Klimabedingungen, die steigende Temperaturen und in einigen Regionen geringere Niederschlagsmengen beinhalten (Gerstengarbe und Werner, 2008), können somit zu einer verstärkten Ausbreitung der infektiösen Stadien und

damit zu vermehrtem Auftreten von Q-Fieber-Ausbrüchen beitragen. Die Multiplikator-Funktion, die *Dermacentor* spp. in der Q-Fieber-Epidemiologie spielen können, wird unter den beschriebenen Klimaveränderungen ebenfalls an Bedeutung zunehmen. So kann der kontaminierte Zeckenkot im Schafsvlies bei Trockenheit leichter eintrocknen und durch den Wind verbreitet werden, was wiederum zur Kontamination der Umwelt und somit zum Auftreten humaner Infektionen beiträgt.

4.2 *RICKETTSIA* SPP.

4.2.1 Molekularbiologischer Nachweis von Rickettsien

4.2.1.1 Zecken

Die *Dermacentor*-Zecken wurden zunächst mit einer real-time PCR des *gltA*-Gens untersucht, die spezifisch für die Gattung *Rickettsia* ist. Von allen positiven Proben wurde im Anschluss daran ein 532bp großes Fragment des *rOmpA*-Gens amplifiziert; diese PCR ist spezifisch für Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe. Anhand der verwendeten PCR-Systeme war keine Unterscheidung der Rickettsienarten möglich. Da das *rOmpA*-Gen der Rickettsien innerhalb der Zeckenstichfieber-Gruppe ausreichend Unterschiede für eine Artbestimmung aufweist (Regnery et al., 1991), wurden die Amplifikate dieser PCR sequenziert. Die Sequenzierung stellt zugleich eine Spezifitätskontrolle dar, da falsch-positive Ergebnisse auf diese Weise ausgeschlossen werden können. Alle Proben, die in der *gltA* real-time PCR und in der *rOmpA*-PCR positiv waren, wurden durch die Sequenzierung eindeutig als Rickettsien (*R. raoultii* oder *R. slovaca*) identifiziert, was die hohe Spezifität der verwendeten Methodik belegt.

In der *rOmpA*-PCR zeigten sich bei der Untersuchung der Zecken häufig unspezifische Banden im Agarosegel. Diese waren anhand ihrer Größe deutlich von positiven Banden zu unterscheiden. Die unspezifischen Banden tauchten nur bei den Zeckenproben, jedoch nie in den Positivkontrollen auf, die aus DNA-Aufreinigungen von Rickettsien-Zellkulturen stammten. Daher ist davon auszugehen, dass die verwendeten Primer unspezifisch an DNA-Sequenzen der Zecken oder anderer Bestandteile der Zeckenproben, wie Bakterien oder Pilze, binden.

Für die anschließende Sequenzierung sollten möglichst reine Amplifikate verwendet werden, da unspezifische Produkte das Sequenzier-Ergebnis deutlich verschlechtern können. Daher wurde die Spezifität der *rOmpA*-PCR durch verschiedene Modifikationen gesteigert. Zunächst wurde die Annealing-Temperatur um 5°C erhöht, wodurch unspezifische Bindungen der Primer minimiert werden. Zudem wurde die Elongationstemperatur auf 72°C erhöht sowie die Elongationszeit um eine Minute verkürzt, um das unspezifische Arbeiten der Taq-Polymerase zu reduzieren. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt bei etwa 74°C; allerdings beginnt das Enzym schon bei Raumtemperatur zu einem gewissen Grad zu arbeiten. Durch

Pipettieren der Reaktionsansätze auf Eis wurde das unspezifische Arbeiten der Taq-Polymerase weiter umgangen. Eine geringere Menge an MgCl_2 erhöht ebenfalls die Spezifität der PCR, gleichzeitig wird allerdings ihre Sensitivität herabgesetzt. Eine MgCl_2 -Konzentration von 2mM erwies sich als optimal, da hier nur noch in seltenen Fällen unspezifische Banden auftauchten. Eine weitere Reduktion der MgCl_2 -Konzentration hätte die Sensitivität der PCR zu weit verringert, sodass positive Zecken eventuell nicht detektierbar gewesen wären.

Mit Hilfe der beschriebenen Modifikationen konnten die Zahl und Häufigkeit unspezifischer Banden stark herabgesetzt werden. Auf diese Weise zeigten sich nur noch bei einzelnen Proben zusätzliche Banden, die jedoch weder die Auswertung erschwerten noch die Sequenzierung beeinflussten.

Unter den Zecken, die von Wildschweinen im Landkreis Karlsruhe stammten, zeigten 25 Proben in der real-time PCR sehr hohe Ct-Werte (>37) und wurden zunächst als schwach positiv eingestuft. Ct-Werte in dieser Höhe können auf falsch-positive Ergebnisse durch unspezifische Reaktionen hindeuten und sind daher immer kritisch zu bewerten.

In der anschließenden *rOmpA*-PCR blieben diese Proben zunächst negativ. Nach einer Reamplifikation zeigten neun der 25 Proben ein positives Ergebnis. Dabei dient das Amplifikat in einem erneuten PCR-Durchlauf als Template und wird somit nochmals vermehrt. Die Notwendigkeit einer Reamplifikation deutet darauf hin, dass in den Proben nur eine sehr geringe Menge an Rickettsien-DNA vorhanden war, die zunächst unterhalb der Nachweisgrenze der *rOmpA*-PCR lag. Mittels Sequenzierung konnten die Reamplifikate eindeutig als Rickettsien-DNA identifiziert werden.

Schwach-positive Proben aus der real-time PCR, die in der *rOmpA*-PCR trotz Reamplifikation negativ blieben, wurden zusätzlich mit einer *gltA*-PCR auf dem Blockcycler getestet. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob es sich bei diesen Proben um *R. helvetica*-infizierte Zecken handelte. Im Gegensatz zu allen anderen Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe fehlt *R. helvetica* das Oberflächenprotein *rOmpA*, sodass sich diese Rickettsienart mit der *rOmpA*-PCR nicht nachweisen lässt (LaScola und Raoult, 1997). *R. helvetica* wurde zwar bisher nur in einzelnen Fällen in *Dermacentor*-Zecken gefunden (Dobec et al., 2009), eine Infektion der Zecken mit dieser Art kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Vier der 14 fraglichen Proben konnten mit der *gltA*-PCR erfolgreich amplifiziert werden. Die anschließende

Sequenzierung ergab in allen Fällen *R. raoultii*. Es bleibt unklar, warum diese Proben in der *rOmpA*-PCR nicht amplifiziert werden konnten. Die übrigen 10 Proben blieben auch in dieser *gltA*-PCR negativ. Hier muss von einem falsch-positiven Ergebnis in der real-time PCR ausgegangen werden.

4.2.1.2 Nager

Für die molekularbiologische Untersuchung der Nager auf Rickettsien wurden Organpools verwendet, die aus je 5x5 mm großen Stücken von Leber, Lunge, Milz und Niere bestanden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da bisher nicht bekannt ist, welche Organe der Nager primär von den Rickettsien befallen werden.

Die Organpools wurden zunächst mit der *rOmpA*-PCR untersucht. Dabei zeigten sich im anschließenden Gelbild jedoch sehr viele unspezifische Banden unterschiedlicher Größe, wodurch die Auswertung der PCR unmöglich wurde. Die Zahl der unspezifischen Banden konnte auch durch Modifikationen wie Erhöhung der Annealingtemperatur, Verkürzen der Elongationszeit und Verringern der MgCl₂-Konzentration nicht verringert werden.

Bei der Verwendung von Organpools ist die Menge an Wirts-DNA sowie an Verunreinigungen, z.B. durch Proteine, die durch die Aufreinigung nicht vollständig entfernt wurden, in den Proben höher als bei der Untersuchung einzelner Organe. Da jedoch die unspezifischen Banden auch bei der Untersuchung einzelner Organe von zwei Nagern auftauchten, kann die Verwendung von Organpools als Ursache für die Schwierigkeiten in der PCR ausgeschlossen werden. Die wahrscheinlichste Ursache für die unspezifischen Banden dürfte somit ein unspezifisches Annealing der Primer an die Nager-DNA sein, sodass in der PCR Fragmente der Nager-DNA mit amplifiziert wurden.

Weiterhin wurden Organpools mit verschiedenen Mengen von *R. conorii*-DNA versetzt, um zu überprüfen, ob der Nachweis von Rickettsien-DNA in Organpools mit dieser PCR grundsätzlich möglich ist. Beim Einsatz einer großen Menge an Rickettsien-DNA ließen sich die spezifischen Banden gut von den unspezifischen unterscheiden. Setzte man den Proben jedoch nur eine geringe Menge an Rickettsien-DNA zu, war die Unterscheidung spezifischer und unspezifischer Banden kaum noch oder sogar überhaupt nicht mehr möglich. Dies zeigt, dass sich Rickettsien-DNA aus Organpools mit dieser PCR zwar grundsätzlich amplifizieren

lässt, jedoch nur dann, wenn sie in großem Überschuss vorliegt; ansonsten sind die unspezifischen Reaktionen zu stark vorherrschend.

Im Gegensatz zur *rOmpA*-PCR ergab die *gltA* real-time PCR für alle Nagerorgan-Proben auswertbare Ergebnisse. Es konnten in keiner Probe Rickettsien nachgewiesen werden. Da bisher nicht bekannt ist, ob und wie lange Rickettsien in Organen infizierter Nager persistieren, lassen sich anhand der negativen PCR-Ergebnisse nur akute Infektionen der Nager ausschließen. Über etwaige zurückliegende Infektionen mit Rickettsien lässt sich jedoch keine Aussage treffen.

In einer Untersuchungen von Schex et al. (2010) wurden Leberproben und Ohrbiopsien von Nagern molekularbiologisch auf Rickettsien untersucht, um zu überprüfen, welches Gewebe sich für den Nachweis am besten eignet. Dabei wurden in sieben von 39 Ohrbiopsien, die von serologisch positiven Nagern stammten, Rickettsien nachgewiesen, wohingegen alle Leberproben negativ waren. Die Autoren vermuten, dass Rickettsien-Infektionen bei Nagern lokalisiert bleiben, sodass die Rickettsien sich v.a. in den Bereichen nachweisen lassen, an denen die meisten Zeckenstiche auftreten. Ohrbiopsien sind demnach für den molekularbiologischen Nachweis von Rickettsien-Infektionen bei Nagern besser geeignet als Organproben.

4.2.2 Serologischer Nachweis von Rickettsien-Antikörpern

Für die serologische Untersuchung der Nager auf Rickettsien-Antikörper wurde zunächst ein für Rickettsien der Zeckenstichfiebergruppe spezifischer ELISA eingesetzt. Dabei wurden ELISA-Platten eines für Humanproben etablierten Kits der Firma Biotrin/Vircell mit einem all-species-Konjugat der Firma Progen kombiniert. Dieses Konjugat besteht aus Peroxidase-gekoppeltem Protein G, einem Zellwandprotein von Staphylokokken, welches in der Lage ist, spezieunabhängig an die Fc-Teile von Antikörpern zu binden. Daher wurden keine spezifischen sekundären Antikörper benötigt, die jeweils nur mit Antikörpern einer bestimmten Tierart reagieren. Auf diese Weise ließ sich für die Nagerproben sowie das als Positivkontrolle dienende Serum eines Rickettsien-infizierten Hundes dasselbe Konjugat verwenden.

Das Hundeserum zeigte in ersten Versuchen keine positive Reaktion im ELISA, obwohl es zuvor im IIFT positiv mit einem Titer von 1:640 getestet wurde (Dr. Torsten Naucke, Labor ParasitusEx e.V., Niederkassel). Alle 75 Nagerseren und -

transsudate, die versuchsweise getestet wurden, waren ebenfalls negativ. Da jedoch, wie oben beschrieben, auch die Positivkontrolle ein negatives Ergebnis erbrachte, lässt sich dieses negative Ergebnis nicht werten.

Es ist denkbar, dass das aus einem ELISA-Kit stammende Konjugat in zu starker Verdünnung vorlag, sodass es nur zu einer schwachen Reaktion mit den Rickettsien-Antikörpern aus dem Hundeserum kam, obwohl diese aufgrund des IIFT-Ergebnisses in hoher Konzentration vorliegen sollten. Da davon auszugehen ist, dass in den Seren bzw. Transsudaten infizierter Nager die Rickettsien-Antikörper nur in geringer Konzentration vorliegen, ist es mit dem verwendeten Konjugat vermutlich nicht möglich, die Antikörper zu detektieren. Dies gilt insbesondere für die Transsudate, die durch Spülung des Brustraums mit 1ml PBS gewonnen wurden und daher die Antikörper schon in stark verdünnter Form enthalten. Um den ELISA erfolgreich zu etablieren, müsste eine Protein-G-Peroxidase in höherer Konzentration verwendet werden.

In einer Studie des Mikrobiologischen Instituts der Bundeswehr in München zeigte sich, dass ein käuflicher, auf Humanseren ausgelegter ELISA für den Nachweis von Rickettsien-Antikörpern in Nagerproben generell schlecht geeignet ist (Dr. Gerhard Dobler, persönliche Mitteilung). Dies wird damit erklärt, dass die ELISA-Streifen mit einer geringen Menge an Rickettsien-Antigen beschichtet sind. Diese reicht zwar aus, um Antikörper in Humanseren nachzuweisen, da Humanseren für gewöhnlich im akuten Krankheitsstadium oder während der Rekonvaleszenz getestet werden; zu diesem Zeitpunkt ist die im Blut zirkulierende Antikörpermenge sehr groß. Für den Nachweis der geringen Antikörper-Titer in Nagerseren und -transsudaten, insbesondere bei zurückliegenden Rickettsien-Infektionen, ist die Antigenmenge hingegen zu gering.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde für die Untersuchung der Nager im Folgenden ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) verwendet, welcher im Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München etabliert wurde (Schex et al., 2010).

Für die Untersuchung der Nagerproben mittels IIFT wurden Objektträger verwendet, die mit *R. conorii*- oder *R. helvetica*-infizierten Zellen beschichtet waren. Beide Arten gehören zur Zeckenstichfieber-Gruppe der Rickettsien. Innerhalb dieser Gruppe sind die Antigen-Unterschiede der einzelnen Arten sehr gering, sodass gegen Erreger dieser Gruppe gerichtete Antikörper starke Kreuzreaktionen aufweisen (Brouqui et

al., 2004). Ein positives IIFT-Ergebnis zeigt daher nur allgemein Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe an; eine Bestimmung der Rickettsienart ist jedoch nicht möglich. Sowohl die Seren als auch alle im *R. conorii*-IIFT positiven sowie einige negativen Transsudate wurden parallel mit *R. helvetica*-beschichteten Objektträgern getestet, da Antikörper gegen *R. helvetica* weniger Kreuzreaktionen mit anderen Mitgliedern der Zeckenstichfiebergruppe zeigen. Sie sind damit eventuell mit den verwendeten *R. conorii*-Objektträgern nicht detektierbar. Da nur eine begrenzte Menge an *R. helvetica*-Objektträgern zur Verfügung stand, konnten nicht alle Proben parallel getestet werden.

Fasst man die Ergebnisse der *R. conorii*- und *R. helvetica*-IIFTs zusammen, so konnten in 15 von 24 Seren (62,5%) aus dem Landkreis Lörrach sowie in 19 von 90 Transsudaten (21,1%) aus dem Ortenaukreis Rickettsienantikörper nachgewiesen werden. In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse beider IIFTs überein, d.h. die Proben waren entweder in beiden Tests negativ oder in beiden Tests positiv. Ein paar Proben ergaben jedoch nur im *R. conorii*-IIFT (fünf Seren, sechs Transsudate) oder nur im *R. helvetica*-IIFT (ein Serum, ein Transsudat) positive Resultate. Ein positiver *R. helvetica*-IIFT bei gleichzeitig negativem *R. conorii*-IIFT deutet darauf hin, dass diese Nager mit *R. helvetica* infiziert waren, wohingegen ein negativer *R. helvetica*-IIFT bei gleichzeitig positivem *R. conorii*-IIFT eher gegen eine *R. helvetica*-Infektion dieser Nager spricht. Eindeutig identifizieren lässt sich die Rickettsienart jedoch auch mit der Durchführung zweier unterschiedlicher IIFTs nicht. Um mittels serologischer Methoden eine Artbestimmung bei Rickettsien durchzuführen, ist die Kombination mehrerer aufwendiger Verfahren nötig, wobei der Western Blot als zuverlässigste Methode gilt (La Scola und Raoult, 1997). In der Humandiagnostik werden solche Untersuchungen nur in spezialisierten Labors durchgeführt.

Viele der als positiv bewerteten Proben zeigten nur schwache Reaktionen im IIFT. Dies ist vermutlich auf die geringe Menge an Rickettsien-Antikörpern im Blut der Nager zurückzuführen. Insbesondere zeigten die Transsudate deutlich schwächere Fluoreszenz als die Serumproben, was sich mit der Gewinnung der Transsudate erklären lässt. Durch die Spülung der Brusträume mit 1ml PBS lagen die Antikörper in stärkerer Verdünnung vor, als dies bei den Seren der Fall war. Die Unterscheidung von positiven und negativen Proben erwies sich insgesamt, besonders bei den Transsudaten, als schwierig. Zudem wurden keine Verdünnungsreihen durchgeführt,

da die Proben schon bei unverdünntem Einsatz nur schwache Fluoreszenz zeigten. Daher wurden keine Antikörpertiter bestimmt, sondern diese nur qualitativ ermittelt. Neben einem niedrigen Antikörpertiter stellt die Lagerung der Proben einen möglichen Grund für die schwachen IIFT-Fluoreszenzen dar. Sämtliche Proben wurden über zwei bis drei Jahre bei -70°C gelagert und in dieser Zeit mehrmals für andere Untersuchungen aufgetaut. Solche wiederholten Auftau- und Einfriervorgänge können Antikörper zerstören und damit zu falsch-negativen Untersuchungsergebnissen führen. Aufgrund dieser methodischen Schwierigkeiten ist nicht auszuschließen, dass einige Proben falsch-negativ gewertet wurden. Trotzdem erscheint die Serologie für die Untersuchung von Nagern auf Rickettsieninfektionen gut geeignet.

4.2.3 Epidemiologische Daten

4.2.3.1 Zecken

Bei der molekularbiologischen Untersuchung von 1016 *Dermacentor* spp., die mit Zeckenfahnen gesammelt wurden („Freilandzecken“), wurden in sieben von neun Untersuchungsgebieten in Süddeutschland Rickettsien mit einer Gesamtprävalenz von 31,4% nachgewiesen. Mittels Sequenzierung des *rOmpA*-Gens wurde *R. raoultii* in 30,6% und *R. slovaca* in 0,8% der Zecken identifiziert. *R. raoultii* wurde in allen sieben Gebieten nachgewiesen, wobei die Befallsrate der Zecken mit Ausnahme von Kleinostheim (2,4%) jeweils zwischen 32% und 39% lag. *R. slovaca* wurde dagegen nur in drei Gebieten identifiziert. Die Prävalenz im Raum Karlsruhe war dabei sehr gering (1-2%), während in Kleinostheim deutlich mehr Zecken mit *R. slovaca* infiziert waren (12%) als mit *R. raoultii* (2,4%). Allerdings lag die Gesamt-Rickettsienprävalenz in diesem Gebiet deutlich niedriger (14,6%) als in allen anderen Gebieten (im Durchschnitt 33,1%).

Bei der Untersuchung von 42 *Dermacentor*-Zecken, die von Haustieren aus unterschiedlichen Gebieten Deutschlands stammten, wurde mit 33,3% eine ähnlich hohe Rickettsienprävalenz ermittelt wie unter den Freilandzecken. Dabei wurde vor allem *R. raoultii* in *D. reticulatus* nachgewiesen. Lediglich in einer *D. marginatus* aus Köln wurde *R. slovaca* identifiziert.

Bisher gibt es aus Deutschland nur einzelne Untersuchungen zur Prävalenz von Rickettsien in *Dermacentor* spp. Der einzige bisherige Fund von *R. slovaca* stammt aus den 1970er Jahren, als Rehacek (1977) in 8 von 51 *D. marginatus* im südlichen Baden-Württemberg diesen Erreger nachwies. *R. raoultii* wurde von Dautel et al. (2006) bei der Untersuchung von *D. reticulatus* (n=135) aus ganz Deutschland mit einer Prävalenz von 23% nachgewiesen. Zusammengefasst lässt sich vermuten, dass *R. raoultii* in *Dermacentor* spp. in ganz Deutschland mit hoher Prävalenz vorhanden ist, während *R. slovaca* offenbar nur lokal begrenzt vorkommt.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit konnten in zahlreichen Studien aus Europa *R. raoultii* und *R. slovaca* in *Dermacentor* spp. nachgewiesen werden; die beiden Arten kamen häufig im selben Untersuchungsgebiet vor.

In Spanien unterschieden sich die Rickettsien-Prävalenzen in Untersuchungen von *D. marginatus* aus verschiedenen Gebieten sehr stark. So wurden *R. slovaca* in 17%-30% sowie *R. raoultii* in 2,6%-73,3% der untersuchten Zecken nachgewiesen. Je nach Untersuchungsgebiet waren die Zecken mit einer der beiden Rickettsienarten stärker infiziert (Ortuno et al., 2006; Marquez et al., 2006; Ortuno et al., 2007). Barandika et al. (2008) identifizierten *R. raoultii* zudem in *D. reticulatus* mit einer Prävalenz von 49,5%.

Punda-Polic et al. (2002) wiesen in Kroatien *R. slovaca* in 36,8% der untersuchten *D. marginatus* nach.

In einer Studie in Portugal wurden sehr hohe Prävalenzen sowohl von *R. raoultii* (38,8%) als auch von *R. slovaca* (20,4%) in *D. marginatus* ermittelt (Vitorino et al., 2007). Selmi et al. (2008) stellten in Italien ebenfalls eine hohe *R. slovaca*-Befallsrate in *D. marginatus* fest (32,1%), die *R. raoultii*-Prävalenz war hier jedoch deutlich geringer (1,8%). In Kroatien wiesen Dobec et al. (2009) *R. slovaca* in 36,8% der *D. marginatus*, aber nur in 3% der *D. reticulatus* nach (Dobec et al., 2009).

Deutlich niedrigere Rickettsien-Prävalenzen zeigten sich in Frankreich, wo Sanogo et al. (2003) *R. slovaca* in 15,7% und *R. raoultii* in 1,4% der untersuchten *D. marginatus* nachwies. Ebenso wurde in den Niederlanden eine Prävalenz von *R. raoultii* in *D. reticulatus* von 14% ermittelt (Nijhof et al., 2007).

Die Rickettsien-Prävalenzen von *Dermacentor* spp. zeigen somit eine große Bandbreite. Sowohl *R. slovaca* als auch *R. raoultii* kommen offenbar jedoch in allen Gebieten vor, in denen *D. marginatus* und *D. reticulatus* endemisch sind.

In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich die im Freiland gesammelten *D. marginatus* und *D. reticulatus* hinsichtlich der Befallsrate mit den beiden Rickettsienarten. Sechs der acht mit *R. slovaca* infizierten Zecken wurden als *D. marginatus* bestimmt (75%), lediglich zwei als *D. reticulatus* (25%). Dagegen wurden von 154 mit *R. raoultii* infizierten Zecken 153 als *D. reticulatus* (99,4%) und lediglich eine als *D. marginatus* (0,6%) identifiziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass *R. slovaca* eher in *D. marginatus* vorkommt, während *R. raoultii* *D. reticulatus* als Wirt bevorzugt. Allerdings wurde nur die Hälfte aller *R. raoultii*-positiven Zecken bis auf Art-Ebene bestimmt, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass doch mehr als eine *D. marginatus* mit *R. raoultii* infiziert war.

Auch in Untersuchungen in anderen europäischen Ländern ließen sich Unterschiede zwischen den *Dermacentor*-Arten hinsichtlich der Befallsrate mit den beiden Rickettsien-Arten feststellen. Allerdings lassen sich anhand dieser Studien keine allgemeinen Aussagen treffen, dass jede Rickettsienart stärker an eine der beiden *Dermacentor*-Arten gebunden ist. Beispielsweise zeigten Ortuno et al. (2007) in *D. marginatus* aus der Region Katalonien (Nordost-Spanien) eine *R. slovaca*-Prävalenz von 33,3%, während die *R. raoultii*-Prävalenz lediglich 2,6% betrug. Dagegen wiesen Marquez et al. (2006) in *D. marginatus* aus der Region Andalusien (Südspanien) *R. slovaca* in 26,7%, *R. raoultii* aber sogar in 73,3% der untersuchten *D. marginatus* nach. Die Unterschiede in den Prävalenzen scheinen somit eher von den Untersuchungsgebieten abzuhängen als von den untersuchten *Dermacentor*-Arten.

Neben den Freilandzecken und den von Haustieren stammenden Zecken wurden 62 *D. reticulatus* untersucht, die von Wildschweinen (*Sus scrofa*) aus dem Kreis Karlsruhe (Hardtwald) stammten. Die Untersuchung dieser Zecken ergab eine sehr hohe *R. raoultii*-Prävalenz von 69,4%. Im Gegensatz dazu wurde in den Freilandzecken aus dem Raum Karlsruhe eine *R. raoultii*-Prävalenz von 32,4% festgestellt, was der durchschnittlichen Befallsrate der *Dermacentor*-Zecken in dieser Arbeit entspricht. Somit ist die Rickettsienprävalenz in dem eng begrenzten Gebiet, in dem die Zecken von wenigen Wildschweinen abgesammelt wurden, deutlich höher als in den übrigen Untersuchungsgebieten im Raum Karlsruhe.

Wildschweine gelten in Südeuropa als Hauptwirte für adulte *Dermacentor* spp. (Ortuno et al., 2007). Zudem wiesen Ortuno et al. (2007) bei 52,2% der untersuchten Wildschweine in Spanien Rickettsien-Antikörper nach, die die Autoren auf *R.*

slovaca-Infektionen zurückführten. Wildschweine könnten also in der Epidemiologie zeckenübertragener Rickettsiosen eine Rolle spielen. Eine serologische Untersuchung der Wildschweine aus dem Hardtwald in Karlsruhe könnte klären, ob die hohe Rickettsienprävalenz in den Zecken mit dem Vorkommen von Rickettsiosen bei Wildschweinen in diesem Gebiet einhergeht.

In anderen europäischen Ländern wurden ebenfalls von Wildschweinen stammende *Dermacentor* spp. untersucht. Dabei ließen sich keine Unterschiede zu von der Vegetation abgesammelten Zecken feststellen. Beispielsweise wiesen in Spanien Ortuno et al. (2007) in *D. marginatus* von Wildschweinen eine *R. slovaca*-Prävalenz von 30,5% nach, während die Prävalenz in *D. marginatus* aus der Vegetation bei 33,3% und damit nur unwesentlich höher lag.

Zusammengefasst lassen diese Untersuchungen vermuten, dass Wildschweine bei der Aufrechterhaltung von Rickettsien-Naturherden eine Rolle spielen könnten. Bisher ist allerdings unklar, ob die Tiere nur als Träger und Verbreiter der Zecken fungieren oder ob sie auch als Reservoirwirte für die Rickettsien dienen.

4.2.3.2 Nager

In allen Untersuchungsgebieten konnten mittels indirektem Immunfluoreszenztest Rickettsien-Antikörper bei Nagern nachgewiesen werden. Die Antikörperprävalenz im Landkreis Lörrach war mit 62,5% (n=24) sehr hoch, während sie im Landkreis Ortenau 21,1% (n=90) und auf der Schwäbischen Alb 11,8% (n=119) betrug. Betrachtet man die Untersuchungsgebiete der Schwäbischen Alb einzeln, so ergeben sich Prävalenzen zwischen 10,8% in Böhringen (n=65) und 23,1% in Westerheim (n=13).

In der vorliegenden Arbeit wurden Rickettsien-Antikörper sowohl bei den *Muridae* als bei den *Arvicolidae* nachgewiesen. Dabei zeigten sich die meisten Infektionen bei *Microtus arvalis* (26,1%) und *Apodemus* spp. (31,7%), wohingegen nur einzelne *Myodes glareolus* (3 Tiere) und *Arvicola terrestris* (2 Tiere) positiv getestet wurden.

Anhand der hier durchgeführten serologischen Methodik war wegen der starken Kreuzreaktionen keine Artbestimmung der Rickettsien möglich. Einen Hinweis darauf, welche Rickettsienarten für die Infektionen der Nager verantwortlich gewesen sein könnten, geben allenfalls die Untersuchungen von Zecken aus denselben Untersuchungsgebieten. Im Landkreis Lörrach wurde neben *R. raoultii* in

Dermacentor spp. in einer früheren Studie *R. helvetica* in *Ixodes ricinus* nachgewiesen (Hartelt, 2004). Somit sind die Infektionen der Nager aus Lörrach vermutlich auf diese beiden Erreger zurückzuführen.

Im Landkreis Ortenau wurden in einer früheren Untersuchung in 5,6% der *Dermacentor* spp. Rickettsien detektiert (Dezfuli, 2006). Die Sequenzierung ergab in der damaligen Studie jedoch kein eindeutiges Ergebnis, sodass eine Identifizierung der Rickettsienart nicht möglich war. Somit gibt es für den Landkreis Ortenau keinen Hinweis, mit welcher Rickettsienart die Nager infiziert gewesen sein könnten. Für die Untersuchungsgebiete der Schwäbischen Alb gibt es bisher keine Untersuchungen der dortigen Zecken auf Rickettsien. In diesen Gebieten sind jedoch keine *Dermacentor* spp. verbreitet, sondern vor allem *I. ricinus*. Da diese Zeckenart vor allem mit *R. helvetica* infiziert ist, sind die Infektionen der Nager der Schwäbischen Alb vermutlich auf diese Rickettsienart zurückzuführen.

Neben Infektionen mit den genannten zeckenübertragenen Rickettsien sind auch Infektionen mit der von Flöhen übertragenen Art *R. felis* möglich. Gilles et al. (2008) wiesen diese Rickettsienart in 9,8% der untersuchten Katzenflöhe aus ganz Deutschland nach; Schex et al. (2010) identifizierten *R. felis* zudem in fünf von 119 Nagern aus Bayern.

Aufgrund des unterschiedlichen Probenmaterials sowie der beschriebenen methodischen Schwierigkeiten ist ein Vergleich der Rickettsien-Prävalenzen in den untersuchten Gebieten nicht zuverlässig möglich. Die Ergebnisse zeigen aber, dass sowohl im Kreis Lörrach als auch im Ortenaukreis und den Landkreisen Reutlingen und Alb-Donau Rickettsien-Infektionen bei Nagern häufig vorkommen. Nager spielen somit wohl eine wichtige Rolle in der Epidemiologie der zeckenübertragenen Rickettsiosen.

Neben den hier durchgeführten Untersuchungen gibt es kaum Daten über die Rickettsien-Prävalenz in Nagern. In einer aktuellen Studie von Schex et al. (2010) wurden 114 Nager aus Bayern serologisch und molekularbiologisch auf Rickettsien-Infektionen untersucht. Dabei zeigten 28,1% der untersuchten Nager positive Reaktionen im IIFT, die Prävalenz lag somit ähnlich hoch wie im Landkreis Lörrach. Mittels PCR wurden zudem in Ohrbiopsien von sieben serologisch positiven Tieren Rickettsien detektiert; die anschließende Sequenzierung ergab in zwei Fällen *R.*

helvetica sowie in fünf Fällen *R. felis*. Auch in dieser Untersuchung zeigten sich Infektionen sowohl bei *Muridae* als auch bei *Arvicolidae*.

Rehacek et al. (1992) zeigten durch Infektionsversuche mit unterschiedlichen Rickettsienarten (*R. sibirica*, *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. akari*), dass eine Reihe von Nagern für Rickettsien-Infektionen empfänglich ist, darunter *Microtus arvalis* und *Apodemus flavicollis*. In einer Untersuchung in China wurden in 9,1% der untersuchten Wildnager Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe mittels PCR in Milzproben von *Arvicolidae* und *Muridae* detektiert (Zhan et al., 2009).

Es wird allgemein angenommen, dass neben Nagern eine Reihe weiterer Säugetiere, u.a. Hirsche, Hasen und Hunde, als Wirte für Rickettsien dienen (Azad und Beard, 1998; Raoult und Roux, 1997). Studien hierzu sind jedoch selten und existieren nur für wenige Rickettsien- und Säugerarten.

Für *R. conorii*, den Erreger des Mittelmeerfleckfiebers, stellen Hunde die wichtigsten Wirte dar (Rovero et al., 2008). Menn et al. (2010) wiesen bei einer Untersuchung von Hunden in Portugal bei 68,2% der untersuchten Tiere Rickettsien-Antikörper nach. Da es sich bei dem Untersuchungsgebiet um ein *R. conorii*-Endemiegebiet handelte, führen die Autoren die Antikörper auf *R. conorii*-Infektionen zurück.

Weiterhin scheinen Wildschweine als Wirte für Rickettsien in Frage zu kommen. In einer Studie in Spanien wiesen 52,2% der Tiere Rickettsien-Antikörper auf. Aufgrund von Kreuzreaktionen war es nicht möglich, die Rickettsienart eindeutig zu bestimmen; die Autoren gehen jedoch von Infektionen mit *R. slovaca* aus.

Weitere Untersuchungen von Wild-, aber auch Haustieren (Hunde, Katzen) sind dringend erforderlich, um die Epidemiologie der Rickettsien weiter aufzuklären.

4.2.4 Medizinische Bedeutung

Sowohl *R. slovaca* als auch *R. raoultii* sind Erreger der zeckenübertragenen Lymphadenitis (TIBOLA = tick-borne lymphadenopathy). Da *Dermacentor*-Zecken weniger anthropophil und sehr viel weniger verbreitet sind als z.B. *Ixodes ricinus*, wird der Mensch durch Zecken dieser Art nur selten gestochen. Die hohen Befallsraten der Zecken, die in einigen Gebieten über 30% betrugen, ergeben jedoch dennoch ein Infektionsrisiko für den Menschen. Dies wird insbesondere durch den ersten Nachweis einer autochthonen *R. slovaca*-Infektion in Deutschland

unterstrichen. Die Patientin zeigte nach dem Stich einer *Dermacentor*-Zecke, der in Rheinland-Pfalz erfolgte, Symptome einer Rickettsiose. Die serologischen Ergebnisse, ein IgM-Titer von 1:64 sowie ein IgG-Titer von 1:1024 gegen Rickettsien der Zeckenstichfieber-Gruppe, deuteten ebenfalls auf eine Rickettsien-Infektion hin, die Bestimmung der Rickettsienart war anhand der Serologie nicht möglich. Der Nachweis von *R. slovaca* in der Zecke mittels PCR und anschließender Sequenzierung belegte jedoch, dass die Patientin an einer durch *R. slovaca* verursachten zeckenübertragenen Lymphadenitis erkrankt war. Dies ist der bisher einzige Nachweis einer autochthonen Rickettsiose in Deutschland.

Die medizinische Bedeutung der TIBOLA wird durch eine Reihe von Studien aus Südeuropa belegt. Raoult et al. (2002) untersuchten 67 Patienten aus Frankreich und Ungarn mit Fieber nach Zeckenstich; in 17 dieser Patienten wiesen sie *R. slovaca*-Infektionen nach. In einer ähnlichen Studien mit 86 Patienten aus Frankreich, die Symptome einer TIBOLA zeigten, wurde in 57% der Fälle *R. slovaca* als Erreger identifiziert, während 8% der Erkrankungen auf Infektionen mit *R. raoultii* zurückzuführen waren (Parola et al., 2009). Selmi et al. (2008) diagnostizierten in Italien in fünf von 17 Patienten mit *Dermacentor*-Stichen TIBOLA; in den zugehörigen Zecken wurde *R. slovaca* identifiziert. In Spanien wiesen Ibarra et al. (2006) bei 19 Patienten TIBOLA nach. Die Untersuchung der Zecken, die von zehn Patienten stammten, zeigte in acht Fällen Infektionen mit *R. slovaca* und in zwei Fällen mit *R. raoultii*. Bisher sind keine schwer verlaufenden TIBOLA-Erkrankungen bekannt; alle bislang untersuchten Patienten zeigten unspezifische, milde Symptome.

Mehrere Studien zeigen, dass die Prävalenz von *R. raoultii* in *Dermacentor* spp. deutlich höher ist als die Befallsrate dieser Zecken mit *R. slovaca*. Dennoch wurden bisher wesentlich mehr TIBOLA-Fälle auf Infektionen mit *R. slovaca* zurückgeführt als auf *R. raoultii*. Daher wird angenommen, dass *R. slovaca* eine höhere Pathogenität für den Menschen aufweist als *R. raoultii* (Parola et al., 2009).

Die aus Südeuropa beschriebenen humanen Fälle von TIBOLA wurden vorwiegend von März bis Mai sowie im September und Oktober diagnostiziert. Dies entspricht den Hauptaktivitätszeiten von *D. marginatus*, was die Annahme bekräftigt, dass *Dermacentor* spp. den Hauptvektor für die beiden TIBOLA-Erreger darstellt (Parola et al., 2009).

Neben *R. raoultii* und *R. slovaca* kommt in Deutschland mit *R. helvetica* eine weitere Rickettsienart mit humanpathogenem Potential vor. In Baden-Württemberg wurde diese Art in 8,9% der untersuchten *Ixodes ricinus* in Baden-Württemberg nachgewiesen (Hartelt, 2004). Ähnlich hohe Befallsraten wurden in Bayern (12%; Wölfel et al., 2006) sowie in Berlin (14,2%; Pichon et al., 2006) ermittelt. *R. helvetica* galt lange Zeit als apathogen; inzwischen gibt es Berichte aus Frankreich, Italien und Schweden, in denen diese Rickettsien-Art mit menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Nilsson et al., 1999b; Fournier et al., 2000; Fournier et al., 2004). Es lässt sich somit feststellen, dass von *R. helvetica*-infizierten *Ixodes ricinus* ebenfalls ein Infektionsrisiko für den Menschen ausgeht, auch wenn bisher keine entsprechenden Infektionen in Deutschland beschrieben wurden.

Bedenkt man das Vorkommen dreier verschiedener Rickettsienarten in Zecken mit teilweise sehr hohen Prävalenzen, so ist es verwunderlich, dass abgesehen von dem oben beschriebenen Fall von TIBOLA bisher keine Fälle von Rickettsiosen in Deutschland beschrieben wurden. Es ist indessen zu vermuten, dass Infektionen mit *R. raoultii*, *R. slovaca* und *R. helvetica* vorkommen, diese jedoch häufig nicht erkannt werden, da es sich z.B. bei der TIBOLA um eine meist sehr mild verlaufende Rickettsiose mit unspezifischen Symptomen handelt. Diese Annahme wird durch eine Studie von Jansen et al. (2008) belegt, bei der unter 286 Jägern aus ganz Deutschland eine Rickettsien-Antikörper-Prävalenz von 9,1% ermittelt wurde. Prinzipiell kommen alle bisher in Deutschland nachgewiesenen Rickettsienarten für solche Infektionen in Frage, da alle ein humanpathogenes Potential zeigen. Durch eine erhöhte Aufmerksamkeit der Ärzte könnten in Zukunft weitere Rickettsiose-Fälle entdeckt werden.

4.2.5 Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von *Rickettsia* spp.

In dieser Arbeit konnten mit *R. raoultii* und *R. slovaca* zwei humanpathogene Rickettsienarten in Zecken der Gattung *Dermacentor* nachgewiesen werden.

D. marginatus, aber auch *D. reticulatus* zeigen momentan ein begrenztes Verbreitungsgebiet in Deutschland, zudem ist ihr Vorkommen in betroffenen Gebieten nicht flächendeckend, sondern kann als inselartig bezeichnet werden. Es ist jedoch damit zu rechnen, dass die prognostizierten Klimaveränderungen für

Deutschland, also in erster Linie eine Erhöhung der Temperatur, auf die beiden thermophilen Arten einen positiven Einfluss haben werden, d.h. ihre Ausbreitung begünstigen können. Dautel et al. (2006) wiesen *D. reticulatus* bereits in einigen Regionen nach, in denen die Art bisher nicht bekannt war. Sie vermuten, dass die Veränderung des Klimas, neben anderen Faktoren, bei dieser Ausbreitung eine Rolle gespielt haben kann. Für *D. marginatus* ist in den nächsten Jahren ebenfalls mit einer Ausbreitung in bisher nicht besiedelte Gebiete zu rechnen. Auf diese Weise können die inselartigen Verbreitungsgebiete langfristig in ein eher flächendeckendes Vorkommen übergehen. Es ist davon auszugehen, dass sich die in dieser Arbeit nachgewiesenen Rickettsienarten gemeinsam mit ihren Vektoren ausbreiten. Dies führt wiederum zu einem erhöhten Infektionsrisiko für die Bevölkerung in den betroffenen Gebieten.

Daneben stellt die Einschleppung und Ansiedlung von bisher in Deutschland nicht endemischen Zecken- und Rickettsienarten ein Risiko dar; hier sind besonders *Rhipicephalus sanguineus* und *R. conorii* zu nennen (Kimmig et al., 2010). *Rh. sanguineus* wurde und wird immer wieder mit Hunden nach Deutschland eingeschleppt (Kimmig et al., 2001a). Momentan kann sich diese Art jedoch aufgrund der hier herrschenden klimatischen Bedingungen noch nicht im Freiland ansiedeln. Bei einer Erhöhung der Temperatur, wie sie für Süddeutschland vorausgesagt wird, kann sich diese Situation jedoch jederzeit ändern. *Rh. sanguineus* stellt im Mittelmeerraum den Hauptüberträger für *R. conorii*, den Erreger des Mittelmeerfleckfiebers, dar. Dabei handelt es sich um eine meist mild verlaufende Rickettsiose, die mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen einhergeht; es können jedoch auch schwere Komplikationen in Form von Thrombosen und inneren Blutungen auftreten (Parola et al., 2005). Hunde stellen im Mittelmeerraum das wichtigste Erregerreservoir dar (Menn et al., 2010). Bei einer Ansiedlung von *Rh. sanguineus* in Süddeutschland und einer anschließenden Einschleppung von *R. conorii* über infizierte Vektoren oder Hunde ist eine Etablierung des Erregers damit jederzeit möglich.

Nach Rovey et al. (2008) gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass *R. conorii* in Europa in anderen Zeckenarten außer *Rh. sanguineus* vorkommt. Eine Etablierung des Erregers in den hier verbreiteten *Dermacentor*-Populationen ist daher nicht zu erwarten.

4.3 FSME-VIREN

4.3.1 Molekularbiologischer Nachweis von FSME-Viren

Der Nachweis von FSME-Viren in *I. ricinus* erfolgte mit Hilfe einer realtime-PCR nach Schwaiger und Cassinotti (2003), bei der ein 68bp großes Fragment der 3'-nichtkodierenden Region amplifiziert wird. Die verwendete PCR ist hochspezifisch für FSME-Viren und erfasst neben Stämmen des europäischen Subtyps auch solche des fernöstlichen und sibirischen Typs. Andere Vertreter der Flaviviren, wie Gelbfieber- oder Hepatitis C-Virus, werden hingegen nicht detektiert (Schwaiger und Cassinotti, 2003).

Für den Nachweis von FSME-Viren in Zecken wurde von Jahn (2009) eine Nachweisgrenze der vorliegenden PCR-Methodik von 10^4 TCID₅₀/ml ermittelt. Infizierte Zecken, die eine geringere Viruslast aufweisen, können mit dieser Methode somit eventuell nicht detektiert werden und zu falsch-negativen Ergebnissen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zecken für die molekularbiologische Untersuchung auf FSME-Viren gepoolt. Dieses Verfahren wurde gewählt, da aufgrund der zu erwartenden geringen FSME-Virus-Prävalenz eine sehr große Zahl an Tieren (600-1000) aus jedem Gebiet untersucht werden musste. Lediglich die Zecken aus Gengenbach wurden einzeln untersucht, da aus diesem Gebiet nur 304 Zecken zur Verfügung standen. Bei der Untersuchung von Zecken-Pools ist zu beachten, dass durch jede im Pool befindliche Zecke die Menge an PCR-Inhibitoren, z.B. Proteinen, erhöht wird. Zudem werden mit jeder zusätzlichen Zecke die eventuell im Pool befindlichen FSME-Viren weiter verdünnt, sodass bei großen Pools die Menge an FSME-Virus-DNA einer einzelnen positiven Zecke unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegen kann. Eine zu große Zahl an Individuen in einem Pool kann somit zu falsch-negativen PCR-Ergebnissen führen. Eistätter et al. (1998) zeigten, dass bei Verwendung von Pools aus zehn Nymphen bzw. fünf adulten Zecken der Nachweis einer einzelnen FSME-Virus-positiven Zecke pro Pool zuverlässig möglich ist. Da für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit dieselben Poolgrößen verwendet wurden, kann ein hemmender Einfluss auf die FSME-Virus-spezifische PCR somit ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden mit der FSME-Virus-spezifischen realtime-PCR in zwei Einzelzecken aus Gengenbach sowie in zwei Pools aus Hagnau am Bodensee und

je einem Pool aus Stuttgart-Botnang und dem Gebiet Hödinger Tobel FSME-Viren nachgewiesen.

Bei der Untersuchung von Zeckenpools auf FSME-Viren geht man aufgrund der zu erwartenden geringen Prävalenz davon aus, dass ein positiv getesteter Pool auf eine einzige FSME-Virus-infizierte Zecke zurückzuführen ist. Da die Pools aus den Gebieten Hagnau am Bodensee und Hödinger Tobel erst nach dem Homogenisieren der Einzelzecken gebildet wurden, war es möglich, die Zecken der drei positiven Pools aus diesen Gebieten individuell zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass aus jedem Pool nur eine einzige Zecke mit FSME-Viren infiziert war. Für den positiven Pool aus Stuttgart-Botnang war kein Nachtesten der Einzelzecken möglich, da dieser Pool bereits vor dem Homogenisierungsschritt gebildet wurde. Aufgrund der übrigen Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass auch in diesem Pool nur eine einzige FSME-Virus-positive Zecke enthalten war.

4.3.2 Anzucht der FSME-Viren

Um ausreichend Material für die anschließende Charakterisierung zu erhalten, wurden die FSME-Viren der sechs Zecken, die in der FSME-Virus-spezifischen realtime-PCR positiv getestet wurden, auf PS-Zellen angezüchtet und über fünf Zellkulturpassagen vermehrt. Für fünf der sechs Proben (GE-M 54, GE-W 37, HB-W 35, HB-N 645 sowie HT-N 682) war die Anzucht erfolgreich; dies wurde zum einen durch mikroskopische Untersuchungen der Zellkultur, zum anderen durch den molekularbiologischen Nachweis der FSME-Viren in den Zellkulturüberständen nachgewiesen.

Der zytopathische Effekt (CPE) bezeichnet die morphologischen Veränderungen, die die Zellen einer Kultur aufgrund der Infektion mit einem Virus zeigen. Diese Veränderungen unterscheiden sich je nach Virus und können Anschwellen oder Schrumpfen der Zellen, die Bildung eines Syncytiums oder die Zerstörung des gesamten Zellmonolayers beinhalten (Leland und Ginocchio, 2007). Im Falle des FSME-Virus zeigt sich der CPE durch Abrunden und Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche. Da von jeder Probe lediglich 200µl Ausgangsmaterial zur Verfügung standen, war eine Sterilfiltration vor der Infektion der ersten Zellkultur nicht möglich. Für die Zellkulturüberstände, die für die weiteren Passagen verwendet wurden, erfolgte hingegen zunächst eine Filtration, um etwaige Verunreinigungen (Bakterien, Pilze) zu beseitigen. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die

beobachteten morphologischen Zellveränderungen tatsächlich auf einen durch die FSME-Viren verursachten CPE zurückzuführen waren.

Nach der Infektion der PS-Zellen mit den FSME-Virus-positiven Zeckenhomogenaten zeigte sich für fünf der sechs Proben nach 5-7 Tagen ein vollständiger CPE. In den darauffolgenden Zellkulturpassagen verkürzte sich der Zeitraum bis zur vollständigen Ausbildung des CPE auf 2-4 Tage. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass in den Zellkulturüberständen wesentlich mehr FSME-Viren vorhanden waren als in den Zeckenhomogenaten. Bei der Untersuchung der Zellkulturüberstände mittels quantitativer realtime-PCR wurde bis zur dritten Zellkulturpassage ein deutlicher Anstieg der FSME-Virus-Konzentration auf bis zu $6,7 \times 10^{13}$ TCID₅₀/ml festgestellt. In den darauffolgenden Passagen sanken die Werte hingegen leicht ab. Um zu klären, ob sich die Viruskonzentrationen auf dem Niveau der fünften Zellkulturpassage ($5,6 \times 10^{11}$ bis $1,7 \times 10^{13}$) einpendeln oder aber weiter absinken, müssten weitere Passagen durchgeführt werden. Ein Absinken der Virustiter nach mehreren Zellkulturpassagen könnte mit genotypischen und phänotypischen Veränderungen der FSME-Viren zusammenhängen, die zu Veränderungen der Virulenz führen können. Solche Veränderungen wurden beispielsweise von Mitzel et al. (2008) nachgewiesen, die Langat-Viren über 20 Passagen sowohl in Maus- als auch in *Ixodes scapularis*-Zellen kultivierten. Je nachdem, an welche Zellart die Viren adaptiert waren, zeigten sich verschiedene Mutationen im Virusgenom. Die Autoren vermuten, dass die beobachteten Mutationen zu Veränderungen der Genomreplikation und der Virulenz führen können. Es ist nicht auszuschließen, dass ähnliche genotypische Veränderungen auch in der vorliegenden Arbeit zum leichten Absinken der Virustiter geführt haben. Allerdings traten die Genomveränderungen bei Mitzel et al. (2008) erst nach der 6. bis 12. Zellkulturpassage auf; eine Veränderung nach nur fünf Passagen erscheint daher unwahrscheinlich.

Für die Probe aus Stuttgart-Botnang, BT-W 05, zeigte sich auch nach drei Zellkulturpassagen kein deutlicher CPE; die FSME-Virus-spezifische realtime-PCR blieb für alle Zellkulturüberstände negativ. Die Anzucht der FSME-Viren gelang aus dieser Probe somit nicht. Möglicherweise wurden die Viren, die als RNA-Viren sehr empfindlich sind, durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Zeckenhomogenats oder eine zu lange Lagerung bei Raumtemperatur zerstört bzw. soweit reduziert, dass eine Infektion der Zellen nicht mehr möglich war. Zudem handelte es sich bei der Probe BT-W 05 um einen Pool aus fünf Weibchen, während

alle anderen zur Anzucht verwendeten Proben Einzelzecken-Homogenate waren. Es ist daher möglich, dass die Infektion der Zellen aufgrund der größeren Menge an Proteinen und Verunreinigungen im Pool-Homogenat nicht erfolgreich war.

4.3.3 Charakterisierung der FSME-Viren

Zur Identifizierung und weiteren Charakterisierung der FSME-Viren aus *I. ricinus* wurden von jedem der fünf Isolate das E-Gen sowie das NS2a-Gen amplifiziert und sequenziert.

Beim Vergleich der Sequenzen zeigte sich, dass die Isolate aus Gengenbach (GE-M 54 und GE-W 37) identisch waren. Die beiden Isolate aus Hagnau am Bodensee (HB-W 35 und HB-N 645) wiesen weitgehende Übereinstimmung untereinander auf, unterschieden sich jedoch von den Proben aus Gengenbach. Die Probe aus dem Gebiet Hödinger Tobel (HT-N 682) wies zu allen anderen Isolaten deutliche Unterschiede auf. Die beiden Gebiete Hagnau am Bodensee und Hödinger Tobel liegen im selben Landkreis und sind nur etwa 20 km voneinander entfernt; dennoch unterscheiden sich die Isolate aus beiden Gebieten in 41-43 Nukleotiden. Im Gegensatz dazu sind sich die Proben aus Hagnau am Bodensee und Gengenbach wesentlich ähnlicher (28-32 Nukleotidunterschiede), obgleich diese Untersuchungsgebiete mit ca. 160 km sehr viel weiter voneinander entfernt liegen.

Bisher gibt es für Deutschland kaum Daten zur Verbreitung unterschiedlicher FSME-Virus-Stämme; auch über Unterschiede in der Virulenz der hier verbreiteten Stämme ist kaum etwas bekannt. Um zu überprüfen, inwieweit die Verbreitungsgebiete der einzelnen Stämme tatsächlich klar getrennt sind, müssten weitere FSME-Viren aus diesen und anderen Gebieten untersucht werden.

Zur Identifizierung der FSME-Virus-Isolate wurden die E-Gen- und NS2a-Gen-Sequenzen aller fünf Proben mit Hilfe von BLAST (Basic local alignment search tool) mit Sequenzen der Gendatenbank GenBank (NCBI) verglichen. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu bewerten, werden im Programm BLAST verschiedene Parameter berechnet. Der bit score ist ein Maß für die Homologie der Ausgangs- mit der Datenbanksequenz. Dabei werden Basenabweichungen und Lücken im Alignment sowie die Länge der untersuchten Sequenzen berücksichtigt und bewertet. Je höher der bit score ist, desto ähnlicher sind sich die beiden Sequenzen; längere Sequenzen ergeben zudem generell einen höheren bit score als

kürzere. Der e-Wert gibt an, wie wahrscheinlich es ist, dass zwei Sequenzen sich nur zufällig ähneln; je näher der e-Wert bei null liegt, desto unwahrscheinlicher ist eine zufällige Übereinstimmung. Längere Sequenzen haben zudem niedrigere e-Werte, da die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung mit zunehmender Länge einer Sequenz abnimmt. Sowohl die e-Werte, die bei allen Proben bei 0,0 lagen, als auch durchgehend hohe bit score-Werte schließen zufällige Übereinstimmungen der untersuchten Sequenzen mit den Einträgen der Gendatenbank aus.

Die beiden Proben aus Hagnau am Bodensee zeigten, übereinstimmend für das E-Gen und das NS2a-Gen, mit 99% (1-5 Nukleotidunterschiede) eine sehr hohe Übereinstimmung mit dem FSME-Virusstamm Salem. Da zu allen anderen FSME-Virus-Stämmen der Datenbank wesentlich größere Unterschiede bestanden, können diese Isolate eindeutig als FSME-Virus-Stamm Salem identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu war weder anhand der E-Gen- noch anhand der NS2a-Gen-Sequenzen eine eindeutige Identifizierung der Proben aus Gengenbach und dem Hödinger Tobel möglich, da sich bei diesen Proben die Ergebnisse der Datenbankrecherche für beide Gene unterschieden. Anhand der E-Gen-Sequenzen wurden die Gengenbacher Proben dem Stamm Salem oder Kumlinge zugeordnet, wohingegen die NS2a-Gen-Sequenzen eine Zuordnung zum Stamm K23 nahelegten. Die Sequenzen der Probe aus dem Hödinger Tobel wurden beim Vergleich der E-Gen-Sequenzen dem Stamm Kumlinge nahegestellt, beim Vergleich der NS2a-Gen-Sequenzen hingegen dem Stamm AS33.

4.3.4 Phylogenetische Analysen

Um eine weitere Charakterisierung der FSME-Virus-Isolate zu ermöglichen, wurden anhand der E-Gen- und NS2a-Gen-Sequenzen der Isolate sowie weiterer FSME-Virus-Sequenzen aus der Gendatenbank GenBank Stammbäume auf Nukleotid- und Aminosäureebene berechnet.

Die für die Berechnung von Stammbäumen zur Verfügung stehenden Methoden beruhen auf unterschiedlichen Berechnungsverfahren. Daher können sich die Stammbäume, die anhand eines einzigen multiplen Sequenzalignments berechnet werden, je nach angewandter Methode deutlich voneinander unterscheiden. Der Vergleich mehrerer Stammbäume gibt somit einen Hinweis auf die Zuverlässigkeit der Berechnungen: stimmt die Stammbaumtopologie bei mehreren

Berechnungsverfahren überein, so kann man davon ausgehen, dass diese mit großer Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen phylogenetischen Beziehungen der verwendeten Sequenzen wiedergibt. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Stammbaumberechnung die Maximum-Parsimony- (MP) sowie die Neighbour-Joining-Methode (NJ) verwendet.

Die Berechnung der Stammbäume anhand zweier Gene ermöglicht weitere Vergleiche und somit eine weitere Bewertung der Zuverlässigkeit der Baumkonstruktion. Taucht ein Cluster in Stammbäumen gleichermaßen auf, so gibt dieses mit größerer Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Verwandtschaftsbeziehungen wieder.

Neben anderen Faktoren ist auch die Länge der für die Stammbaumberechnung verwendeten Sequenzen für die Zuverlässigkeit des Ergebnisses entscheidend. Je kürzer die DNA-Abschnitte sind, desto größeren Einfluss haben zufällige Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen auf die Baumtopologie. In der vorliegenden Arbeit standen sowohl für das E-Gen (1490bp) als auch für das NS2a-Gen (1136bp) sehr lange Sequenzen zur Verfügung; daher kann der Einfluss zufälliger Ähnlichkeiten als minimal angesehen werden.

Als weiteres Bewertungskriterium wurden für alle Stammbäume Bootstrap-Werte berechnet, mit deren Hilfe die Zuverlässigkeit eines Stammbaums an jedem Knotenpunkt beurteilt werden kann. Werte über 90 zeigen dabei Gruppierungen an, die von den verwendeten Daten sehr gut unterstützt werden, wohingegen bei Werten unter 70 die Verwandtschaftsverhältnisse nicht zuverlässig wiedergegeben werden.

Alle berechneten Stammbäume (siehe Abb. 33-36) geben die Einteilung der FSME-Viren in fernöstlichen, sibirischen und europäischen Subtyp deutlich wieder. Darüber hinaus sind die Verhältnisse innerhalb des fernöstlichen und des sibirischen Subtyps in allen Bäumen nahezu identisch. Dies spiegelt sich auch in den hohen Bootstrap-Werten wider (meist >70). Im Gegensatz dazu weisen die Verzweigungen innerhalb des europäischen Subtyps vielfach niedrige (<70) bis sehr niedrige (<50) Bootstrap-Werte auf; zudem unterscheiden sich die einzelnen Cluster hier deutlich zwischen den Stammbäumen. Übereinstimmend wurden auch in anderen Untersuchungen hohe Bootstrap-Werte (>70) innerhalb des fernöstlichen und sibirischen Subtyps berechnet, während innerhalb des europäischen Subtyps größtenteils niedrige Werte (<70) ermittelt wurden (Kupca et al., 2010; Brinkley et al., 2008; Lundkvist et al.,

2001; Haglund et al., 2003). Nach Lindquist und Vapalahti (2008) sind sich die Stämme innerhalb des europäischen Subtyps sehr ähnlich. Dies kann ein Grund dafür sein, dass sich die Stämme bei der Stammbaumberechnung nicht eindeutig gruppieren lassen, sondern verschiedene Baumtopologien mit jeweils geringen Bootstrap-Werten ermöglichen. Daher ist eine klare und zuverlässige Einteilung der Stämme des europäischen Subtyps kaum möglich. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Stämme innerhalb des sibirischen und fernöstlichen Subtyps deutlicher voneinander, was eindeutige Gruppierungen mit hohen Bootstrap-Werten ermöglicht (Lindquist und Vapalahti, 2008).

Das zu den Flaviviren gehörende Louping-ill-Virus ist näher mit dem europäischen Subtyp des FSME-Virus verwandt als mit dem fernöstlichen bzw. sibirischen Typ (Grard et al, 2007; Lindquist und Vapalahti, 2008; Mansfield et al., 2009). Diese Position wird in allen Stammbäumen deutlich und ist durch hohe Bootstrap-Werte (76-100) unterstützt.

Da alle berechneten Stammbäume sowohl die Position des Louping-ill-Virus als auch die Verhältnisse innerhalb des fernöstlichen und sibirischen Subtyps weitgehend identisch und mit hohen Bootstrap-Werten wiedergeben, kann insgesamt von einer hohen Zuverlässigkeit der Stammbäume ausgegangen werden.

Die fünf FSME-Virus-Isolate aus *I. ricinus* werden in allen Stammbäumen dem europäischen Subtyp zugeordnet; die genaue Position unterscheidet sich jedoch jeweils.

Die Isolate aus **Hagnau am Bodensee** (HB-N 645 und HB-W 35) werden übereinstimmend in allen acht Stammbäumen in ein gemeinsames Cluster mit dem Virusstamm Salem eingeordnet. Dies stimmt mit den Ergebnissen der BLAST-Recherche überein, bei der sich nur in einzelnen Nukleotiden Unterschiede zwischen den Hagnau-Isolaten und dem Stamm Salem zeigten. Das Cluster Salem/Hagnau wird zudem durch sehr hohe Bootstrap-Werte unterstützt. Diese liegen in allen E-Gen-Stammbäumen sowie in den NS2a-Gen-Bäumen auf Nukleotidebene bei 95-100. Lediglich in den NS2a-Gen-Bäumen auf Aminosäure-Ebene wird dieses Cluster mit Werten von 45 (NJ) und 39 (MP) weniger stark unterstützt. Fasst man die Ergebnisse der BLAST-Recherche und der Stammbaumanalyse zusammen, so handelt es sich bei den Isolaten aus Hagnau am Bodensee mit großer Sicherheit um Vertreter des FSME-Virus-Stamms Salem. Dieser wurde im Jahr 2007 erstmals aus

dem Gehirn eines an FSME erkrankten Makaken des Affenbergs in Salem isoliert. Die Infektion erfolgte wohl auf natürlichem Wege über einen Zeckenstich (Süss et al., 2008).

Die Einordnung der beiden identischen Isolate aus **Gengenbach** (GE-M 54 und GE-W 37) in den FSME-Virus-Stammbaum ist weniger eindeutig und wird generell durch geringere Bootstrap-Werte unterstützt. Insgesamt werden die Isolate in allen E-Gen-Bäumen in die Nähe der Stämme Salem und Kumlinge eingeordnet, wohingegen in den NS2a-Gen-Bäumen eine größere Nähe zu den Stämmen Neudoerfl, AS33 und K23 gegeben ist. Dies spiegelt die Ergebnisse der BLAST-Recherche wider, bei der sich für die E-Gen-Sequenzen die höchste Übereinstimmung mit den Stämmen Salem und Kumlinge, für die NS2a-Gen-Sequenzen hingegen mit K23 und AS33 zeigte. Sowohl in den E-Gen- als auch in den NS2a-Gen-Stammbäumen wird die Zuordnung der Proben nur von geringen Bootstrap-Werten (19-33 für das E-Gen, 10-35 für das NS2a-Gen) unterstützt.

Da sich die Zuordnung der Gengenbacher Isolate vor allem zwischen den beiden untersuchten Genen stark unterscheidet, ist somit eine eindeutige Einordnung in den Stammbaum nicht möglich. Um dies zu erreichen, wäre die Untersuchung eines weiteren DNA-Abschnitts oder des gesamten Virusgenoms nötig.

Für das Isolat aus dem Gebiet **Hödinger Tobel** (HT-N 682) ergeben sich in den E-Gen- und NS2a-Gen-Stammbäumen sehr ähnliche Gruppierungen. Diese werden jedoch durch relativ schwache Bootstrap-Werte unterstützt. In den E-Gen-Stammbäumen werden die Proben weitgehend übereinstimmend den FSME-Virus-Stämmen AS33 und K23 zugeordnet, mit Bootstrap-Werten zwischen 13 und 37. In den Stammbäumen der NS2a-Gen-Sequenzen wird die Gruppierung mit dem Stamm AS33 ebenfalls deutlich, die Bootstrap-Werte liegen bei 28-41. Zudem ist meist eine große Nähe zum Stamm Neudoerfl gegeben. Bei der BLAST-Recherche zeigte sich für die NS2a-Gen-Sequenzen ebenfalls die größte Übereinstimmung mit dem Stamm AS33, wohingegen für die E-Gen-Sequenzen die Übereinstimmung mit dem Stamm Kumlinge am höchsten war. Eine Nähe zum Stamm Kumlinge zeigt sich jedoch in keinem der berechneten Stammbäume, sodass wohl von einer nahen Verwandtschaft zum Stamm AS33 ausgegangen werden kann. Dieser FSME-Virus-Stamm wurde 2010 erstmals aus Zecken isoliert, die aus dem Landkreis Amberg-

Sulzbach in Bayern stammten (Kupca et al., 2010); die phylogenetischen Untersuchungen der Autoren zeigten eine nahe Verwandtschaft mit dem Stamm K23.

Insgesamt unterscheiden sich die Topologien aller Stammbäume innerhalb des europäischen Subtyps sehr stark voneinander; lediglich die E-Gen-Stammbäume auf Nukleotidebene zeigen bei Berechnung mit MP und NJ eine vollkommen identische Topologie. Diese Voraussetzungen erschweren die Einordnung der Isolate aus Gengenbach und dem Gebiet Hödinger Tobel, die sich beide deutlich voneinander sowie von allen bekannten Virusstämmen unterscheiden.

Es existieren nur wenige vergleichbare Studien zur Phylogenie von FSME-Virus-Stämmen aus anderen europäischen Ländern (u.a. Lundkvist et al., 2001; Haglund et al., 2003; Han et al., 2005; Casati et al., 2006; Carpi, 2009; Klaus et al., 2010). Die Einteilung der FSME-Viren in europäischen, fernöstlichen und sibirischen Subtyp wird in jeder dieser Studien deutlich. Allerdings wurden in den einzelnen Untersuchungen jeweils unterschiedliche FSME-Virus-Stämme zur Baumkonstruktion herangezogen, sodass alle Stammbäume innerhalb der einzelnen Subtypen sehr unterschiedliche Topologien aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden für die phylogenetischen Untersuchungen zwei sehr lange DNA-Abschnitte (E-Gen und NS2a-Gen in voller Länge) verwendet. Die in der Gendatenbank hinterlegten Vergleichssequenzen vieler FSME-Virus-Stämme sind häufig deutlich kürzer und konnten daher nicht für die Baumkonstruktion verwendet werden, sodass nur eine begrenzte Anzahl von Sequenzen zur Verfügung stand.

Aus den genannten Gründen sind somit Vergleiche der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Stammbäume mit denjenigen aus anderen Studien kaum möglich.

Die durch die Sequenzierung und die Stammbaumanalyse gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass in einem Naturherd jeweils nur ein einziger FSME-Virus-Stamm vorherrscht, es also nicht zur Vermischung mehrerer Stämme kommt. Gleichzeitig ist es jedoch möglich, in nahe beieinanderliegenden Gebieten unterschiedliche Virusstämmen nachzuweisen, was die kleinräumige Verteilung von FSME-Virus-Naturherden bestätigt. Um diese Erkenntnisse weiter zu festigen, müsste eine größere Zahl an FSME-Viren aus diesen und weiteren Gebieten charakterisiert werden.

4.3.5 Epidemiologische Daten

In der vorliegenden Arbeit wurden 7842 *I. ricinus* aus 11 Untersuchungsgebieten in Baden-Württemberg molekularbiologisch auf FSME-Viren untersucht. Zur Auswahl der Untersuchungsgebiete wurden dabei verschiedene Kriterien herangezogen (s. Tab. 7). Für sieben Gebiete existieren bereits Daten zu FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken aus den 1990er Jahren, was einen Vergleich aktueller und früherer Daten ermöglicht. Die Gebiete Hagnau am Bodensee und Oberprechtal wurden hingegen aufgrund der hohen Zahl an FSME-Erkrankungen in den letzten Jahren ausgewählt, um zu klären, ob sich hohe Fallzahlen in der Bevölkerung in hohen FSME-Virus-Befallsraten der Zecken widerspiegeln.

Insgesamt wurden in sechs *I. ricinus* aus vier Gebieten FSME-Viren nachgewiesen. In allen Untersuchungsgebieten lagen die Befallsraten niedriger als in den Untersuchungen aus den 1990er Jahren.

Im Landkreis Bodenseekreis wurden im Gebiet **Hödinger Tobel** in einer von 1131 Zecken FSME-Viren nachgewiesen (0,09%), während in **Hagnau am Bodensee** zwei von 1167 Zecken infiziert waren (0,17%). Im Gegensatz dazu wiesen Oehme et al. (2002) in den 1990er Jahren im Gebiet Hödinger Tobel in 26 von 1114 *I. ricinus* FSME-Viren nach, was einer sehr hohen Prävalenz von 2,3% entspricht.

Die höchste FSME-Virus-Prävalenz wurde mit 0,66% in **Gengenbach** im Landkreis Ortenau festgestellt; hier waren zwei von 304 Tieren infiziert. Auch dieser Wert liegt deutlich unter demjenigen aus den 1990er Jahren, als Oehme et al. (2002) im Kinzigtal bei 20 von 1405 Zecken FSME-Viren nachwiesen (Prävalenz: 1,4%).

Auch in **Stuttgart-Botnang** (Stadtkreis Stuttgart) wurde eine geringere FSME-Virus-Prävalenz als in früheren Untersuchungen festgestellt. Während in der aktuellen Studie eine von 795 Zecken positiv getestet wurde (0,13%), waren in den 1990er Jahren 4 von 868 Zecken (0,5%) aus diesem Gebiet infiziert (Oehme et al., 2002).

Den niedrigen Zeckenbefallsraten in diesen Gebieten stehen hohe FSME-Erkrankungszahlen gegenüber (Robert Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 26.1.2011). Der Ortenaukreis ist mit durchschnittlich 21,2 Erkrankungen pro Jahr (212 Fälle von 2001-2010) der am stärksten betroffene Landkreis innerhalb Deutschlands. Auch der Bodenseekreis gehört mit durchschnittlich 4,8 FSME-Fällen jährlich zu den stark betroffenen Gebieten. Im Stadtkreis Stuttgart liegt die Zahl der jährlich gemeldeten Fälle zwar

deutlich niedriger (durchschnittlich 2,2 Erkrankungen/Jahr), er gehört jedoch ebenfalls zu den stark betroffenen Kreisen.

In den Untersuchungsgebieten **Bodanrück** und **Großbottwar** wurden keine FSME-Virus-infizierten *I. ricinus* nachgewiesen. Demgegenüber stehen Daten aus den 1990er Jahren, als im Gebiet Bodanrück in 11 von 943 Zecken (1,2%) FSME-Viren detektiert wurden (Oehme et al., 2002); im Gebiet Großbottwar waren bei Oehme et al. (2002) 10 von 1250 Tieren (0,8%) infiziert. Für die Gebiete **Hausach**, **Oberprechtal** und **Pulverdinger Holz**, in denen ebenfalls keine mit FSME-Viren infizierten Zecken nachgewiesen wurden, stehen keine Vergleichsdaten zur Verfügung.

Auch die Untersuchungsgebiete, in denen in der vorliegenden Untersuchung keine Naturherde detektiert wurden, liegen in Landkreisen, in denen jedes Jahr viele FSME-Erkrankungen registriert werden; die durchschnittlichen Fallzahlen liegen zwischen 2,7 im Landkreis Ludwigsburg (Gebiete Großbottwar und Pulverdinger Holz) und 21,2 im Ortenaukreis (Gebiet Hausach). Das Auftreten humaner FSME-Virus-Infektionen zeigt, dass in allen Landkreisen Naturherde existieren müssen.

Für die im Vergleich zu früheren Studien gesunkenen Virusprävalenzen in Gebieten, die aufgrund von humanen Infektionen eindeutig als Endemiegebiete charakterisiert sind, kommen verschiedene Ursachen in Frage.

Die FSME-Virus-Naturherde sind sehr kleinräumig, d.h. infizierte Zecken können in einem Gebiet sehr inhomogen verteilt sein (Kimmig et al., 2001a; Mansfield et al., 2009). Es ist daher möglich, dass beim Sammeln der Zecken die Bereiche im Untersuchungsgebiet, in denen sich Naturherde befinden, verfehlt wurden. In diesem Fall spiegelt die ermittelte Befallsrate nicht die tatsächliche Virusprävalenz in der Zeckenpopulation des Untersuchungsgebiets wider. Um diesen „Sammelfehler“ zu umgehen, müssten die Untersuchungsgebiete in gleichmäßige Raster unterteilt werden, sodass eine eventuelle inhomogene Verteilung von FSME-Virus-infizierten Zecken sichtbar wird.

Die gesunkenen FSME-Virus-Prävalenzen in den Untersuchungsgebieten könnten jedoch auch durch Veränderungen und Verschiebungen der Naturherde selbst zustande kommen. Naturherde sind begrenzte geographische Bereiche, in denen ein

Erreger zwischen Vektor und Wirt zirkuliert; dabei bestehen komplexe Beziehungen zwischen den beteiligten Arten (Hiepe et al., 2006). Für die Aufrechterhaltung eines solchen Herdes müssen daher optimale Lebensbedingungen für alle Beteiligten herrschen. Dieses empfindliche Gleichgewicht wird durch äußere Faktoren beeinflusst, was wiederum zu Veränderungen innerhalb eines Herds führen kann. Die Naturherde, die in den 1990er Jahren noch vorhanden waren, könnten sich demnach durch veränderte Lebensbedingungen für Zecken oder deren Wirtstiere geographisch verschoben oder aufgelöst haben. Neben einem suboptimalen Mikroklima kommen als beeinflussende Faktoren auch eine veränderte Landnutzung, ein Rückgang der Wirtspopulationen durch harte Winter sowie zu hohe Sommertemperaturen verbunden mit steigender Austrocknungsgefahr für die Zecken in Frage. Auch Bedingungen, die die gleichzeitige Aktivität von Larven und Nymphen in einem Gebiet verhindern, können die Auflösung eines Naturherds nach sich ziehen, da sie das für die Erregerübertragung entscheidende Co-feeding unterbinden (Süss, 2008; Gray et al., 2009)

Anders stellt sich die Situation im Gebiet Oberprechtal im Schwarzwald dar. Dieses Gebiet wurde für die Untersuchung ausgewählt, da der Landkreis Emmendingen mit 6,5 Erkrankungen jährlich eine hohe FSME-Fallzahl aufweist, jedoch bisher keine Untersuchungen an Zecken aus diesem Gebiet vorliegen. Im Untersuchungsgebiet herrschten Nadelbäume vor, sodass nur geringer Bodenbewuchs vorhanden war. Ein solches Habitat ist jedoch für *I. ricinus* und damit vermutlich auch für FSME-Virus-Naturherde nicht optimal, was ein Grund für die negativen Untersuchungsergebnisse für dieses Gebiet sein kann.

Insgesamt betrachtet, scheinen die Zeckenbefallsraten in den Gebieten, für die Vergleichsdaten aus den 1990er Jahren existieren, gesunken zu sein. Allerdings lässt sich nicht beurteilen, ob die niedrigeren Werte tatsächlich auf Veränderungen der FSME-Virus-Prävalenz bzw. der Naturherde beruhen, oder durch die inhomogene Verteilung infizierter Zecken in einem Gebiet zustande gekommen sind. Zudem sind verlässliche Vergleiche aufgrund der sehr niedrigen Prävalenzen, die auf nur ein bis zwei positive Zecken pro Gebiet zurückzuführen sind, sehr schwierig. Um aussagekräftigere Vergleiche anstellen zu können, müsste die Zahl der untersuchten Zecken wesentlich größer sein; dies ist jedoch aufgrund des hohen Arbeitsaufwands kaum möglich.

Es existieren nur wenige weitere Daten zur FSME-Virus-Prävalenz in *I. ricinus* in Deutschland; diese sind zudem nicht flächendeckend, sondern beziehen sich jeweils nur auf begrenzte Gebiete. Oehme et al. (2002) wiesen in verschiedenen Regionen Baden-Württembergs Befallsraten zwischen 0,2% und 2,3% nach. Ähnliche Werte ermittelten Süss et al. (2002) in Bayern (Raum Passau; 2%) und Baden-Württemberg (Raum Freiburg; 0,2-3,4%). In der Region Odenwald wurden Befallsraten von 0,5% festgestellt (Süss et al., 2004). Insgesamt liegen die FSME-Virus-Prävalenzen in Zecken in Deutschland somit zwischen 0,2 und 3,4%.

Für andere Länder Europas liegen ebenfalls nur wenige vergleichbare Daten vor. Die FSME-Virus-Prävalenzen, die in den wenigen Studien ermittelt wurden, liegen jedoch in ähnlichen Größenordnungen (0,1-1,5%) wie in Deutschland. So wurden in *I. ricinus* Virusbefallsraten von 0,3% in Finnland und Nordost-Italien (Han et al., 2001; D'Agaro et al., 2009), 0,6% in Tschechien (Danielova et al., 2002), 0,1-0,4% in Schweden (Brinkley et al., 2008) sowie 0,5% in der Schweiz (Gäumann et al., 2010) ermittelt.

Zur Bewertung des Infektionsrisikos der Bevölkerung innerhalb eines Landkreises wird aktuell die Zahl der an das Robert-Koch-Institut übermittelten FSME-Erkrankungen herangezogen. Bei zunehmender Durchimpfungsrate der Bevölkerung ist dies jedoch nicht mehr zuverlässig möglich.

Beispielsweise wurde in Österreich mit Hilfe von umfangreichen Impfkampagnen eine sehr hohe Impfrate innerhalb der Bevölkerung erreicht. Im Jahr 2007 waren 88% der Einwohner mindestens einmal geimpft, 58% befanden sich im korrekten Impfschema, wiesen also vollständigen Impfschutz auf. Während in Österreich vor Beginn der Impfkampagne mit 600-700 FSME-Fällen pro Jahr die höchsten Fallzahlen in Europa registriert wurden, hat sich die Zahl inzwischen drastisch auf 70-80 Fälle pro Jahr reduziert. Es existieren jedoch weiterhin Naturherde, d.h. das Infektionsrisiko für nicht geimpfte Personen ist nach wie vor hoch (Süss, 2008).

In Baden-Württemberg waren im Jahr 2009 durchschnittlich 28,1% der Bevölkerung geimpft, während es im Jahr 2003 noch 6,4% waren (RKI, 2009). Hält die Zunahme der Impfrate weiter an, so stellt die Untersuchung der FSME-Virus-Prävalenz in Zecken und damit der Nachweis der Existenz von Naturherden in einem Gebiet eine zusätzliche Möglichkeit zur Risikoabschätzung dar. Daher sind weiterführende

Untersuchungen nötig, um die FSME-Virus-Prävalenz in Zecken in Baden-Württemberg flächendeckend zu erfassen.

4.3.6 Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von FSME-Viren

Die Zahl der in Deutschland jährlich gemeldeten FSME-Erkrankungen ist seit den 1980er Jahren deutlich gestiegen. Von 1992 bis 2010 wurden etwa 100-300 Fälle pro Jahr gemeldet, während vor 1992 nie mehr als 100 Erkrankungen jährlich bekannt wurden (Abb. 43). Besonders viele Fälle wurden in den Jahren 2005 (431) und 2006 (546) registriert, während in den darauffolgenden Jahren die Fallzahlen wiederum auf 200 bis 300 sanken (Süss, 2008).

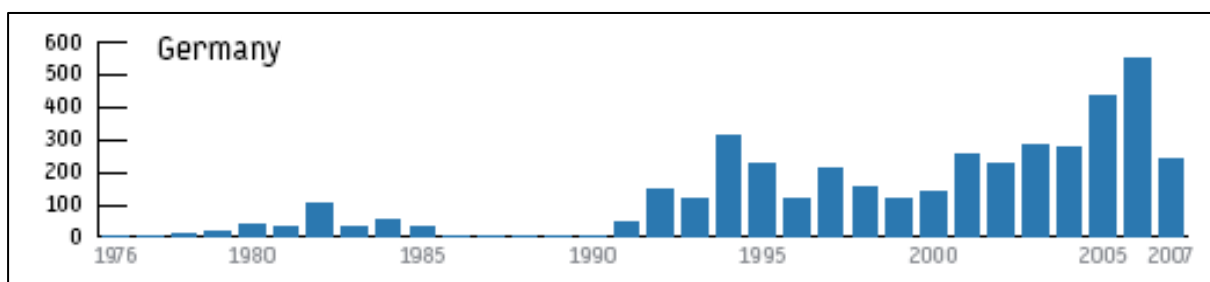


Abb. 43: FSME-Fälle in Deutschland, 1976-2007 (Süss, 2008).

Auch außerhalb Deutschlands wurden in den letzten Jahrzehnten steigende FSME-Fallzahlen registriert. So betrug die durchschnittliche jährliche Zahl an FSME-Erkrankungen in den Jahren 1976-1989 für Europa und Russland 2755 (1452 für Europa allein). Dagegen wurden in den Jahren 1990-2007 jährlich 8755 Fälle in Europa und Russland bekannt (2805 ohne Russland). Dies entspricht einer Steigerung von bis zu 400% (Süss, 2008). Die Zunahme der FSME-Fallzahlen ist allerdings sehr heterogen, d.h. es zeigen sich sowohl innerhalb eines Landes als auch zwischen einzelnen Ländern große Unterschiede (Sumilo et al., 2007; Randolph et al., 2004; Rizzoli et al., 2009).

Das Infektionsrisiko für den Menschen basiert auf der Häufigkeit der Exposition gegenüber FSME-Virus-infizierten Zecken. Diese ist wiederum abhängig vom menschlichen Verhalten, das sich je nach sozioökonomischen Bedingungen sowie

Arbeits- und Freizeitverhalten unterscheidet. Daneben spielen die Überlebensrate der Zecken und die Aufrechterhaltung der Naturzyklen eine Rolle, die von biotischen (Häufigkeit und Verbreitung von Zeckenwirten, Empfänglichkeit der Wirte, Anteil immuner Wirte) und abiotischen Faktoren (lokale klimatische Bedingungen, Vegetation) beeinflusst werden (Rizzoli et al., 2009; Kiffner et al., 2010). Daher können für die Zunahme der FSME-Erkrankungen in nahezu allen Endemiegebieten verschiedene Faktoren verantwortlich sein.

Unbestritten ist, dass das Klima (insbesondere Temperatur und Niederschlag) das Überleben und die Aktivität von *I. ricinus* beeinflussen (Gray, 2009; Randolph und Rogers, 2000), was wiederum Auswirkungen auf das Auftreten von FSME-Virus-Infektionen haben kann. Es gibt jedoch nur wenige Untersuchungen, in denen ein klarer Zusammenhang zwischen den Klimaveränderungen der letzten Jahre und der gleichzeitigen Steigerung der Erkrankungszahlen gezeigt wurde.

In Schweden stieg die Zahl der jährlichen FSME-Erkrankungen zwischen den 1980er und 1990er Jahren stark an. Lindgren (1998) wies eine Korrelation zwischen dem Anstieg der Erkrankungszahlen und milderen Wintern sowie höheren Frühlings- und Herbsttemperaturen nach. Auch zwischen Erkrankungszahlen und längeren Frühjahrs- und Herbstperioden wurde ein Zusammenhang festgestellt. Die Zahl und Temperatur der Sommertage spielte hingegen keine Rolle. Die Autoren schlossen daraus, dass ein milderes Klima das saisonale Auftreten der FSME verlängern und das Infektionsrisiko durch Begünstigung der Übertragung oder der Naturzyklen erhöhen kann. Neben dem Anstieg der FSME-Erkrankungen wurde in Schweden im selben Zeitraum (1980er bis 1990er Jahre) auch eine Steigerung der Abundanz von *I. ricinus* sowie eine Ausbreitung der Zecken nach Norden festgestellt (Lindgren et al., 2000). Auch hierbei wurde ein Zusammenhang mit den klimatischen Veränderungen, d.h. milderen Wintern sowie milderen und längeren Frühjahrs- und Herbstperioden, nachgewiesen.

In Tschechien wurde, begründet durch eine Erhöhung der Temperatur, eine Ausbreitung der Zecken in höhergelegene Gebiete innerhalb der letzten zwanzig Jahre festgestellt (Danielova et al., 2006). Während die Verbreitungsgrenze von *I. ricinus* in den 1980er Jahren bei etwa 700-800m lag, wurde die Art im Jahr 2003 bis auf 1200m nachgewiesen. Bei fortschreitenden Klimaveränderungen kann sich diese Ausbreitung weiter fortsetzen, ebenso wie die in Schweden beobachtete

Ausdehnung des Verbreitungsgebiets von *I. ricinus* in nördlichere Breiten (Lindgren, 1998). Sowohl in Tschechien als auch in Schweden wurde die Bildung neuer FSME-Virus-Endemiegebiete in den erweiterten Verbreitungsgebieten von *I. ricinus* sowie ein damit einhergehender Anstieg der FSME-Fallzahlen beobachtet (Lindgren, 1998; Daniel et al., 2004; Zeman und Benes, 2004).

Wie sich die Klimaveränderungen auf die Abundanz der Zecken innerhalb der bereits bekannten Verbreitungsgebiete auswirken, lässt sich hingegen kaum voraussagen.

Die Hauptaktivitätszeit von *I. ricinus* liegt in den Monaten März bis Oktober, während sich die Tiere zwischen November und März in die Bodenschicht zurückziehen und keinerlei Aktivität zeigen sollen (Kimmig et al., 2001a). Diese Situation kann sich jedoch durch milde Temperaturen in den Wintermonaten ändern. So untersuchten Dautel et al. (2008) während des ungewöhnlich milden Winters 2006/2007, in dem die Temperaturen 4,6°C über dem langjährigen Mittelwert lagen, die Aktivität von Nymphen und Adulten in einem Berliner Waldgebiet. Beide Stadien wiesen während des Untersuchungszeitraums (November 2006 bis März 2007) deutliche Aktivität auf. Zudem wurden im Januar/Februar 2007 vier Fälle von FSME-Erkrankungen gemeldet; die Zecken waren somit auch in süddeutschen Endemiegebieten während des Winters aktiv (Gray et al., 2009). Aufgrund der milderer Winter, die für Süddeutschland prognostiziert werden, ist in Zukunft mit einer verstärkten Winteraktivität von *I. ricinus* und damit mit einer Zunahme von FSME-Virus-Infektionen während der Wintermonate zu rechnen.

Neben dem Klima spielen auch andere, häufig anthropogene Einflüsse eine entscheidende Rolle in der Epidemiologie der FSME-Virus-Infektionen.

Besonders hervorzuheben ist hierbei die Situation in osteuropäischen Ländern. Hier wurde zu Beginn der 1990er Jahre ein extremer Anstieg der FSME-Fallzahlen registriert, der zeitlich mit dem politischen Umbruch nach dem Ende der Sowjetunion zusammenfiel. Dies legte einen Zusammenhang zwischen beiden Ereignissen nahe, was durch verschiedene Untersuchungen bestätigt wurde. In den baltischen Staaten zeigte sich keine Korrelation zwischen dem dramatischen Anstieg der FSME-Fallzahlen und der Erhöhung der Temperatur im selben Zeitraum (Sumilo et al., 2007). Die Autoren machen daher Veränderungen in der Landwirtschaft und ein verändertes Freizeitverhalten für den Anstieg der FSME-Erkrankungen verantwortlich. Diese sozioökonomischen Faktoren werden, zumindest für

Osteuropa, auch von anderen Autoren als entscheidender angesehen als die Veränderung des Klimas (Randolph, 2010a; Vanwambeke et al., 2010). Der politische Umbruch führte zu vielfältigen Veränderungen in allen Lebensbereichen. Die Neuorganisation der Landwirtschaft zog weitreichende Vegetationsveränderungen nach sich, beispielsweise durch brachliegende Felder. Dies und der reduzierte Einsatz von Pestiziden hatten verbesserte Lebensbedingungen für Zecken und Wirte zur Folge. Verändertes Arbeits- und Freizeitverhalten, beispielsweise das verstärkte Sammeln von Pilzen, und der damit einhergehende häufigere Aufenthalt im Wald resultierten in einer erhöhten Exposition, also einem höheren Zeckenstich-Risiko. All diese Veränderungen können zu dem plötzlichen, extremen Anstieg der FSME-Erkrankungen in Osteuropa beigetragen haben (Randolph, 2010a; Vanwambeke et al., 2010).

Der Einfluss derartiger sozioökonomischer Veränderungen erklärt jedoch nicht den Anstieg der FSME-Erkrankungen in stabilen westlichen Ländern wie Schweden, Italien, Finnland oder Deutschland (Süss, 2008); hier kommen weitere anthropogene Einflüsse, die zu Veränderungen innerhalb der FSME-Virus-Naturherde führen, zum Tragen. Beispielsweise wurde in Norditalien mit Beginn der 1990er Jahre ein Anstieg der FSME-Fallzahlen in einigen Provinzen verzeichnet, während in anderen Provinzen keinerlei Fälle auftauchen (Rizzoli et al., 2009). Die Klimaveränderungen waren in betroffenen und nicht betroffenen Regionen jedoch identisch, waren also nicht für die unterschiedlichen Entwicklungen der Infektionszahlen verantwortlich. Die Autoren wiesen jedoch nach, dass in den Provinzen mit steigenden FSME-Fallzahlen der Rehwild-Bestand in den letzten 50 Jahren stärker gestiegen ist als in den übrigen Provinzen. Da Rehwild in Norditalien einer der Hauptwirte für adulte *I. ricinus* ist, gehen die Autoren davon aus, dass sich durch die Bestandserhöhung die Lebensbedingungen für die Zecken verbessert haben, was wiederum die Bildung von FSME-Naturherden positiv beeinflusst hat. Weiterhin zeigte sich, dass der Anteil an Hochwald in den betroffenen Provinzen, nicht jedoch in den übrigen Gebieten, in den letzten Jahren gestiegen ist. Diese Waldform bietet sowohl für viele Nagerarten (z.B. *Apodemus flavicollis*) als auch für Zecken optimale Lebensbedingungen, sodass auch durch diese Entwicklung die Bildung von FSME-Virus-Naturherden gefördert wurde. Die Veränderungen im Wildtierbestand und in der vorherrschenden Waldform sind laut Rizzoli et al. (2009) auf anthropogene Einflüsse durch Veränderungen in der Waldwirtschaft und in der Wildpflege zurückzuführen.

Fasst man die Erkenntnisse aller Untersuchungen zusammen, so liegt die Vermutung nahe, dass eine Kombination aus Klimaveränderungen und klimaunabhängigen, oft anthropogenen Faktoren für die Steigerung der FSME-Fallzahlen in den letzten Jahrzehnten verantwortlich ist (Randolph, 2010b). Dabei ist die Rolle, die jeder einzelne Faktor spielt, aufgrund der komplexen Interaktionen nur schwer zu bewerten. Aus diesem Grund lässt sich auch die zukünftige Entwicklung der Zahl an FSME-Virus-Infektionen nur schwer einschätzen.

4.4 HANTAVIREN

4.4.1 Untersuchung von Nagern auf Puumala-Virus-Infektionen

4.4.1.1 *Molekularbiologische und serologische Untersuchung*

Für den **molekularbiologischen** Nachweis von Puumala-Viren wurden Lungengewebeproben der Nager mit Hilfe einer Puumala-Virus-spezifische RT-nested-PCR (Essbauer et al., 2006) untersucht. Auch in anderen Studien war Lungengewebe für den Nachweis von Puumala-Viren in Nagern gut geeignet (u.a. Bowen et al., 1997; Sironen et al., 2002; Dekonenko et al., 2003; Razzauti et al., 2009). In einer Studie von Essbauer et al. (2006) wurden auch in den Nieren positiver Tiere häufig Puumala-Viren nachgewiesen, während andere Organe (Leber, Milz, Herz, Blase) nur in Einzelfällen positive Ergebnisse brachten.

Insgesamt wurden mittels PCR in 33 von 57 Rötelmäusen Puumala-Viren nachgewiesen. In 26 Fällen zeigte sich bereits nach der ersten PCR eine starke Bande im Agarosegel, was auf eine große Menge an Puumala-Viren in den Lungengewebe dieser Tiere schließen lässt. Lediglich sieben Proben zeigten erst in der nested-PCR positive Ergebnisse. Möglicherweise waren in den Proben Störfaktoren (z.B. Proteine) vorhanden, die die PCR beeinträchtigten; denkbar ist jedoch auch, dass diese Proben eine geringere Menge an Viren aufwiesen. Dies kann zum einen auf eine tatsächlich geringere Erregermenge hindeuten, etwa bei sehr frischen oder im Abklingen befindlichen Infektionen. Zudem ist denkbar, dass ein Teil der Virus-RNA in den Proben durch RNasen abgebaut wurde. Dies kann durch längere Lagerung der Proben bei Raumtemperatur oder wiederholte Einfrier- und Auftauvorgänge geschehen. Da jedoch alle Proben gleich behandelt wurden und nur wenige Proben eine geringe Virusmenge aufwiesen, kann ein die PCR beeinflussender teilweiser Abbau der Virus-RNA nahezu ausgeschlossen werden.

Hantaviren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität bezüglich ihres Nagerreservoirs aus, d.h. jeder Hantavirus-Typ ist an eine bestimmte Nagerart besonders angepasst und an diese gebunden (Lednicky, 2003). Reservoirwirt des in Süddeutschland verbreiteten Puumala-Virus ist die Rötelmaus, *Myodes glareolus*. „Spillover“-Infektionen, d.h. Infektionen anderer Nagerarten mit Puumala-Viren, sind extrem selten, können jedoch bei sympatrisch lebenden Arten nicht ausgeschlossen werden. Um solche spillover-Infektionen in den Untersuchungsgebieten auszuschließen,

wurden nicht nur Rötelmäuse, sondern auch andere Nager auf Puumala-Virus-Infektionen getestet. Es wurden jedoch ausschließlich in *M. glareolus* Infektionen nachgewiesen, alle übrigen Arten (*Microtus arvalis*, *Apodemus* spp. und *Sorex* spp.) erwiesen sich als negativ.

Für die **serologische** Untersuchung der Nager mittels ELISA wurden Transsudate verwendet, die durch Spülung der Brusthöhle mit 1ml PBS gewonnen wurden. Dieses Probenmaterial erwies sich bereits in früheren Untersuchungen als geeignet zum Nachweis von Hantavirusantikörpern (Essbauer et al., 2006; Schlegel et al., 2009).

Alle Tiere wurden zunächst mit einem für Viren der Puumala-Gruppe spezifischen ELISA, bei dem Puumala-Nukleokapsid-Proteine als Antigene dienten, auf IgG-Antikörper getestet. Ebenso wie bei den molekularbiologischen Untersuchungen wurden auch im ELISA lediglich Rötelmäuse positiv getestet (20 von 57), während in keiner anderen Nager- oder Insectivora-Art IgG-Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe nachgewiesen wurden.

Alle *Apodemus* spp. wurden zudem mit Hilfe eines für Viren der Hantaan-Gruppe spezifischen ELISA getestet, bei dem Dobrava-Nukleokapsid-Proteine als Antigene verwendet wurden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um zu überprüfen, ob im Untersuchungsgebiet neben den Puumala- auch Dobrava-Viren vorkommen. Deren Reservoirwirte sind Mäuse der Gattung *Apodemus* (*Apodemus flavicollis*, *A. agrarius*). In Deutschland ist dieser Virustyp bisher vor allem im Norden und Osten verbreitet, aus Süddeutschland gibt es bisher keine Nachweise (Schlegel et al., 2009); auch in der vorliegenden Arbeit wurden in keiner der 36 untersuchten *Apodemus* spp. IgG-Antikörper gegen Dobrava-Viren nachgewiesen.

Vergleicht man die Ergebnisse der molekularbiologischen und serologischen Untersuchungen, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Insgesamt wurden 104 Nager sowie 15 Insectivora untersucht, wobei mit beiden Methoden ausschließlich in Rötelmäusen Puumala-Infektionen nachgewiesen wurden. 33 von 57 Rötelmäusen waren in der Puumala-PCR positiv; von diesen zeigten 20 im ELISA Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe. 13 Tiere waren PCR-positiv, jedoch negativ im ELISA. In keinem Fall wurden Hantavirus-Antikörper bei PCR-negativen Rötelmäusen detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PCR im Vergleich zum

ELISA die sensitivere Methode zum Nachweis von Puumala-Infektionen in Nagern darstellt. Man geht davon aus, dass mit Hantaviren infizierte Nager persistierende Infektionen entwickeln (Easterbrook und Klein, 2008). Dies könnte erklären, warum sich in allen seropositiven Tieren Viren molekularbiologisch nachweisen ließen. Bei vorübergehenden Infektionen können hingegen lediglich die persistierenden Antikörper dauerhaft nachgewiesen werden, während sich die Erreger selbst mittels PCR nicht mehr detektieren lassen.

Mit Hilfe des hier verwendeten ELISA wurden lediglich IgG-Antikörper in den Transsudaten nachgewiesen. Möglicherweise stammten die Proben, die im ELISA negativ, in der PCR jedoch positiv getestet wurden, von Tieren mit sehr frischen Infektionen, die noch keine IgG-Antikörper gebildet hatten. Um dies zu überprüfen, müssten die Proben zusätzlich auf Antikörper der Klasse IgM untersucht werden, die bereits in einem sehr frühen Stadium der Infektion nachweisbar sind.

Für alle 13 ELISA-negativen Proben wurden Sequenzen gewonnen, die mittels BLAST als Puumala-Virus-Sequenzen identifiziert wurden. Somit wurden falsch-positive PCR-Ergebnisse ausgeschlossen und die Spezifität der PCR bestätigt.

Innerhalb der beiden Hantavirus-Gruppen bestehen starke Kreuzreaktionen, die bei serologischen Untersuchungen berücksichtigt werden müssen; so zeigen Antikörper gegen Puumala-Viren Kreuzreaktivität gegenüber Tula-Viren und den nur in Nordamerika verbreiteten Sin-Nombre-Viren (Vapalahti et al., 2003). In einer früheren Untersuchung wurden in Nagern (*Microtus arvalis* und *Arvicola terrestris*) aus der Gemeinde Römerstein Tula-Viren nachgewiesen (Ernst, 2000), d.h. im Untersuchungsgebiet Römerstein zirkulieren zwei Hantavirus-Subtypen, die Kreuzreaktivität aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch in allen im ELISA positiven Rötelmäusen mit Hilfe der Puumala-Virus-spezifischen PCR Erreger nachgewiesen, was durch die Sequenzierung der Amplifikate bestätigt wurde. Kreuzreaktionen im für die Puumala-Gruppe spezifischen ELISA können somit ausgeschlossen werden.

Auf die zusätzliche molekularbiologische Untersuchung der Nager auf Tula-Viren wurde verzichtet, da dieser Virustyp keine oder allenfalls sehr geringe Humanpathogenität aufweist und daher medizinisch keine Rolle spielt.

4.4.1.2 Sequenzierung der PCR-Produkte

Um die in den Rötelmäusen detektierten Puumala-Viren genauer zu charakterisieren, wurden die Amplifikate der S-Segment-PCR sequenziert. Für 31 der 33 positiven Proben konnten Sequenzen gewonnen werden, lediglich für zwei Proben brachte die Sequenzierung keine Ergebnisse. Diese Proben zeigten nur in der nested-PCR positive Ergebnisse mit schwachen Banden im Agarosegel. Es ist daher denkbar, dass die Menge an Ausgangs-DNA in den Amplifikaten für eine erfolgreiche Sequenzierung nicht ausreichte.

Beim Vergleich der Nukleotidsequenzen aller Proben zeigten sich fünf Sequenzvarianten (R1-R5), die z.T. mehrfach detektiert wurden. Diese Varianten unterschieden sich in 1-8 Nukleotiden bzw. 0,3-1,9% voneinander.

Hinsichtlich der geographischen Verteilung der Puumala-Viren zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Untersuchungsgebiet Böhringen wurden die beiden Varianten R1 und R2 nachgewiesen, die sich mit 8 Nukleotiden am stärksten voneinander unterschieden. Die beiden Proben aus Donnstetten und Westerheim waren identisch (R3), während sich die beiden in Zainingen detektierten Sequenzen (R4 und R5) in zwei Nukleotiden unterschieden. Somit wurden zum einen, wie im Gebiet Böhringen, sich deutlich unterscheidende Sequenzen in einem einzigen Gebiet detektiert; zum anderen wurden in den Untersuchungsgebieten Donnstetten und Westerheim, die etwa 2 km voneinander entfernt liegen, identische Sequenzen nachgewiesen. Insgesamt zeigt die Detektion von fünf unterschiedlichen Sequenzvarianten innerhalb des begrenzten Gebiets der Gemeinden Römerstein und Westerheim die große genetische Diversität der Puumala-Viren.

Ähnlich große oder sogar größere Diversität wurde auch in anderen Studien bei Puumala-Viren aus einem begrenzten Gebiet detektiert. So zeigten Essbauer et al. (2006) bei Puumala-Viren in Rötelmäusen aus Bayern Unterschiede im S-Segment von 0,2-3,1%, während in Dänemark Unterschiede von bis zu 5%, in Finnland von 0,2-1,1% im selben Genombereich ermittelt wurden (Sironen et al., 2002; Razzauti et al., 2009).

Anhand der genetischen Variabilität lassen sich die Puumala-Viren in Linien (engl. sublineages) unterteilen, die Nukleotidunterschiede im S-Segment von 14-20% aufweisen und sich phylogenetisch klar trennen lassen (Heiske et al., 1999; Essbauer et al., 2006; Razzauti et al., 2009). Zudem bilden die Linien geographische

Cluster: so ist beispielsweise die südkandinavische Linie in Südnorwegen und Zentralschweden verbreitet, während die nordskandinavische Linie in Nordschweden vorkommt. (Razzauti et al., 2009). Innerhalb Deutschlands wurden mehrere Linien der Puumala-Viren beschrieben, die sich in 14,7-16,3% des S-Segments unterscheiden und ebenfalls geographische Cluster bilden (Heiske et al., 1999; Essbauer et al., 2006; Ulrich et al., 2008).

Der Vergleich der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen S-Segment-Sequenzen mit Daten der Gendatenbank GenBank (NCBI) zeigte nur geringe Unterschiede (1-3%) zu anderen Puumala-Sequenzen aus Baden-Württemberg (Landkreise Böblingen, Stuttgart, Alb-Donau). Hingegen waren die Unterschiede zu Sequenzen aus Bayern mit 8-9% bereits deutlich größer und erreichten 16-17% Nukleotidunterschiede zu Puumala-Viren aus dem Raum Köln. Die Puumala-Viren von der Schwäbischen Alb lassen sich somit derselben Linie zuordnen wie die Puumala-Viren aus anderen Gebieten Baden-Württembergs.

Im Gegensatz zu den Nukleotidsequenzen waren die abgeleiteten Aminosäuresequenzen, die einem 146 Aminosäuren umfassenden Fragment des Nukleokapsid (N)-Proteins entsprachen, bei allen Proben identisch. Auch in anderen Untersuchungen zeigten die abgeleiteten N-Protein-Fragmente von Puumala-Viren aus Rötelmäusen eine deutlich größere Ähnlichkeit zueinander als die zugehörigen Nukleotidsequenzen (Essbauer et al., 2006; Razzauti et al., 2009).

Die beobachteten Unterschiede in den Nukleotidsequenzen führten also nicht zum Einbau abweichender Aminosäuren. Dies deutet darauf hin, dass zumindest das hier untersuchte, 146 Aminosäuren umfassende Teilstück des N-Proteins sehr konserviert ist und sich zwischen einzelnen Puumala-Virus-Isolaten nur wenig unterscheidet. Es bleibt jedoch unklar, ob sich an anderen Stellen des N-Proteins Unterschiede zwischen den Puumala-Viren aus Römerstein finden lassen. Hierzu müsste das gesamte S-Segment, das eine Länge von ca. 1700bp aufweist (Modrow et al., 2010), sequenziert und daraus die zugehörige gesamte Aminosäuresequenz des N-Proteins (430 Aminosäuren; Figueiredo et al., 2008) abgeleitet werden.

4.4.1.3 Epidemiologische Daten

Insgesamt wurden 119 Nager und Insectivora, darunter 57 Rötelmäuse, aus vier Untersuchungsgebieten auf der Schwäbischen Alb (Gemeinden Römerstein und Westerheim) auf Puumala-Virus-Infektionen untersucht.

In 33 von 57 Rötelmäusen wurden Puumala-Viren nachgewiesen; dies entspricht einer Gesamt-Prävalenz von 57,9%.

In allen vier Untersuchungsgebieten wurden viruspositive Mäuse detektiert. Das Gebiet Böhringen wies mit 77,8% die höchste Prävalenz auf; hier wurden in 28 von 36 Rötelmäusen Viren nachgewiesen. In diesem Gebiet wurde zudem die größte Anzahl an Rötelmäusen gefangen und untersucht; aus den anderen Gebieten standen mit 8 (Donnstetten), 11 (Zainingen) und 2 (Westerheim) Tieren nur wenige Proben zur Verfügung.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich in Rötelmäusen Puumala-Viren bzw. Antikörper gegen Viren der Puumala-Gruppe nachgewiesen. Die Proben aller übrigen Nager- und Insectivora-Arten erwiesen sich hingegen als negativ. Es gibt somit keine Hinweise auf sogenannte „spillover“-Infektionen, d.h. Infektionen anderer Nagerarten im selben Untersuchungsgebiet.

Generell zeichnen sich Hantaviren durch eine hohe Spezifität in Bezug auf ihr Nager-Reservoir aus (Krüger, 2009; Lednicky, 2003); spillover-Infektionen wurden jedoch in einzelnen Fällen für die meisten Hantavirustypen beschrieben. So wiesen Klingström et al. (2002) in Belgien Puumala-Viren in *M. glareolus*, aber auch in *Microtus arvalis* und *Apodemus sylvaticus* nach. Tula-Viren wurden nicht nur in ihrem Hauptwirt, der Feldmaus *Microtus arvalis*, detektiert, sondern auch in anderen *Microtus*-Arten (*M. agrestis*, *M. rossiaemeridionalis*, *M. subterraneus*) und anderen Vertretern der *Arvicolidae* (*Arvicola terrestris*, *Lagurus lagurus*) (Ernst, 2000; Schmidt-Chanasit et al., 2010). Dobrava-Virus-Infektionen wurden in begrenzten Gebieten sowohl in *Apodemus flavicollis* als auch in *A. agrarius* und *A. sylvaticus* ermittelt (Schlegel et al., 2009). Aufgrund der Kreuzreaktivitäten von Hantavirus-Antikörpern sind für den Nachweis von spillover-Infektionen einfache serologische Untersuchungen (z.B. ELISA) nicht ausreichend; diese müssen durch Neutralisationstests oder molekularbiologische Verfahren (PCR, Sequenzierung) ergänzt werden (Klingström et al., 2002).

Bereits im Zeitraum 1997-2000 wurden Rötelmäuse, die aus Untersuchungsgebieten innerhalb der Gemeinde Römerstein stammten, auf Puumala-Virus-Infektionen untersucht (Kimmig et al., 2001b). Dabei wurde eine durchschnittliche Prävalenz von 10% ermittelt, die jedoch in einzelnen Jahren schwankte. Während in den Jahren 1998 und 1999 mit 3,5% und 4,5% sehr geringe Infektionsraten detektiert wurden, zeigten sich 1997 und 2000 deutlich höhere Prävalenzen von 15,7% und 18,4%.

Im Vergleich dazu liegt die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Prävalenz aus dem Jahre 2007 mit 57,9% um ein vielfaches höher.

Betrachtet man die Zahl der humanen Puumala-Infektionen im Landkreis Reutlingen (Tab. 33), so wird deutlich, dass die Zahl der Erkrankungen im Jahr 2007 mit 181 Meldungen extrem hoch ist, während in anderen Jahren (Ausnahme: 2010) weniger als 15 Fälle pro Jahr gemeldet wurden. Die hohe Prävalenz von Puumala-Viren in Rötelmäusen aus der Gemeinde Römerstein im Jahr 2007 spiegelt somit die hohe Zahl an humanen Erkrankungen in diesem Landkreis im selben Zeitraum wider.

Da die Meldepflicht für Hantavirus-Erkrankungen erst seit 2001 besteht, gibt es für die Untersuchungsjahre 1997-2000 keine vergleichbaren Daten humaner Hantavirus-Infektionen.

Tab. 33: Zahl der gemeldeten Hantavirus-Erkrankungen im Landkreis Reutlingen, 2001-2010 (Quelle: Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 1.3.2011)

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
gemeldete Erkrankungen	2	15	6	6	7	1	181	7	7	113

Es existieren nur wenige vergleichbare Daten zur Prävalenz von Puumala-Viren in Rötelmäusen aus Deutschland und anderen europäischen Ländern; die jeweils ermittelten Infektionsraten fallen sehr unterschiedlich aus und liegen je nach Studie zwischen 3,4% und 66% (Heyman et al., 2009; Sironen et al., 2002; Razzauti et al., 2009). So wurde beispielsweise in Köln im Jahr 2005 eine Puumala-Virus-Infektionsrate von 66% bei Rötelmäusen aus dem Stadtpark ermittelt; zeitgleich war eine Häufung von humanen Puumala-Virus-Erkrankungen in diesem Gebiet festzustellen (Essbauer et al., 2007). In den darauffolgenden Jahren lag die Virusprävalenz in Rötelmäusen im selben Gebiet mit 19,2% bis 28,6% deutlich niedriger, was sich auch in einer geringeren Zahl an Erkrankungsfällen

widerspiegelte (Ulrich et al., 2008). Auch in Frankreich wurden im selben Untersuchungsgebiet je nach Studie sehr unterschiedliche Infektionsraten von 9,8% und 22,4% ermittelt (Sauvage et al., 2002; Augot et al., 2008).

Sowohl die Untersuchungen von Kimmig et al. (2001b) aus dem Gebiet Römerstein als auch einige Studien aus anderen Untersuchungsgebieten (Sauvage et al., 2002; Essbauer et al., 2006; Augot et al., 2008; Ulrich et al., 2008) zeigen starke jährliche Schwankungen der Puumala-Virus-Prävalenz von Rötelmäusen. Um zu überprüfen, ob die in der vorliegenden Arbeit ermittelte hohe Prävalenz von 57,9% eine dauerhaft hohe Infektionsrate im Gebiet Römerstein widerspiegelt oder ebenfalls auf Schwankungen beruht, sind kontinuierliche Untersuchungen der Rötelmäuse aus diesem Gebiet nötig.

4.4.2 Untersuchung von Humanseren auf Puumala-Viren

Bei Infektionen mit Puumala-Viren ist die virämische Phase nur sehr kurz, d.h. die Viren zirkulieren nur für kurze Zeit im Blut. Sie sind daher nur in den ersten Tagen nach Krankheitsbeginn molekularbiologisch im Blut nachweisbar (Vaheri et al., 2008).

Mit der molekularbiologischen Untersuchung von Humanseren, die zuvor serologisch auf Puumala-Virus-Antikörper getestet wurden, sollte die Eignung der PCR für die Hantavirus-Diagnostik überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden 78 Seren, die zuvor im Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg mittels ELISA positiv auf Puumala-Virus-Antikörper untersucht worden waren, mit einer RT-nested-PCR des S-Segments getestet; daneben wurden 156 im ELISA negative Seren von Patienten untersucht, bei denen der Verdacht auf eine Puumala-Infektion bestand.

Insgesamt wurden in 35,9% aller serologisch positiven sowie in 1,3% der serologisch negativen Proben Puumala-Viren mittels PCR detektiert. Von den 30 PCR-positiven Seren wiesen 25 IgM- und IgG-Antikörper auf, in drei Proben waren lediglich IgM-Antikörper nachweisbar. Zwei weitere Proben erwiesen sich in der PCR als positiv, im ELISA jedoch als negativ. Dagegen wurden in keiner der Proben, die lediglich IgG-Antikörper aufwiesen, Viren nachgewiesen.

Bei Hantavirus-Infektionen sind Antikörper der Klasse IgM schon sehr früh, d.h. bei oder kurz nach Auftreten der ersten Symptomatik, nachweisbar; IgG-Antikörper

treten häufig erst nach der akuten Krankheitsphase auf (Krüger, 2009). Sobald der IgM-Titer ansteigt, sinkt die Menge an Viren im Blut, d.h. die Virämie ist bei einer Puumala-Virus-Infektion nur kurz. Evander et al. (2007) zeigten, dass sich Puumala-Viren im Blut von Patienten bereits vor Auftreten der ersten IgM-Antikörper nachweisen lassen.

Die meisten Seren, in denen in der vorliegenden Arbeit Puumala-Viren mittels PCR detektiert wurden, wiesen IgM-Antikörper auf, d.h. die Blutabnahme erfolgte in einer frühen Phase der Infektion, in der noch eine deutliche Virämie bestand. In keiner der Proben, die lediglich IgG-Antikörper enthielten, wurden Viren mittels PCR nachgewiesen. In diesen Fällen erfolgte die Blutabnahme während einer späteren Krankheitsphase, d.h. nach Abklingen der Virämie.

Der Nachweis von Puumala-Viren in serologisch negativen Proben könnte auf sehr frische Infektionen zurückzuführen sein, d.h. dass die Blutabnahme in einem Stadium erfolgte, in dem noch keine IgM-Antikörper gebildet wurden. Zur Überprüfung dieser Vermutung müssten Seren dieser Patienten aus einem späteren Krankheitsstadium erneut auf IgM- und IgG-Antikörper untersucht werden.

Um die in den Humanseren detektierten Puumala-Viren weiter zu charakterisieren, wurden die Amplifikate der S-Segment-PCR sequenziert. Da es sich in allen Fällen um nested-PCR-Amplifikate handelte, standen für die anschließenden Vergleiche nur relativ kurze Sequenzen von 276bp zur Verfügung.

Beim Vergleich aller Sequenzen zeigten sich vier Sequenzvarianten, die jeweils mehrfach vertreten waren, sowie 12 Varianten, die nur ein einziges Mal detektiert wurden. Die Varianten unterschieden sich in 0,4-5,8% (1-16 Nukleotide).

Die Seren stammten aus den Landkreisen Calw, Böblingen, Stuttgart, Esslingen und Reutlingen und somit aus einem relativ eng begrenzten Gebiet. Da die Herkunft der Proben jedoch nur bis auf Landkreisebene bekannt war, war eine genaue geographische Zuordnung der Sequenzvarianten nicht möglich. Es lässt sich daher keine Aussage darüber treffen, ob die Varianten in geographischen Clustern vorkommen.

Der Vergleich der S-Segment-Sequenzen aus den Humanseren mit denjenigen aus den Nagerproben aus Römerstein auf Nukleotidebene zeigte keine Übereinstimmungen. Vergleicht man jedoch die aus den Nukleotidsequenzen

abgeleiteten Aminosäuresequenzen untereinander, so stimmten die Sequenzen aus Nager- und Humanproben zu 100% überein. Lediglich eine einzige Sequenz, die aus einem Humanserum aus dem Landkreis Böblingen stammte, wich in einer einzigen Aminosäure von den übrigen Sequenzen ab.

Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung, dass es sich bei dem untersuchten Abschnitt des S-Segments um ein hoch konserviertes Teilstück des N-Proteins handelt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Aminosäuresequenzen aus den Humanseren mit einer Länge von nur 89 Aminosäuren aufgrund der zugrundeliegenden kurzen nested-PCR-Amplifikate nochmals deutlich kürzer sind als die aus Nagerproben zur Verfügung stehenden Sequenzen. Für eine genauere Charakterisierung der Puumala-Viren aus den Humanseren ist die Untersuchung eines größeren Abschnitts des S-Segments nötig.

Ebenso wie die Puumala-Viren aus Nagern aus dem Untersuchungsgebiet Römerstein wiesen auch die in den Humanseren detektierten Puumala-Viren auf Nukleotidebene eine starke Ähnlichkeit mit anderen Puumala-Viren aus Baden-Württemberg auf (96-100% Übereinstimmung mit Einträgen der Gendatenbank). Dies deutet darauf hin, dass die in der vorliegenden Arbeit detektierten Puumala-Viren ein gemeinsames Cluster mit anderen Viren aus Baden-Württemberg bilden. Um dies zu bestätigen, sind phylogenetische Untersuchungen nötig, die auf einem möglichst großen Fragment des S-Segments oder auf dem gesamten Genom beruhen sollten.

Bisher gibt es keine Erkenntnisse darüber, ob sich die Sequenzvariationen der Puumala-Viren, die auch in dieser Arbeit bei den in Nagern und Humanseren nachgewiesenen Viren beobachtet wurden, auf die Virulenz auswirken.

Insgesamt erwies sich die PCR für die Diagnose von Puumala-Virus-Infektionen als nützliche Methode zur Ergänzung der serologischen Untersuchung. Dies gilt insbesondere für Patienten in einem frühen Krankheitsstadium, d.h. mit nachweisbarem IgM-Titer. Zudem ist die molekularbiologische Untersuchung für eine Charakterisierung der in einem Gebiet zirkulierenden Puumala-Viren unerlässlich.

4.4.3 Einfluss von Klimaveränderungen auf die Epidemiologie von Hantaviren

Die Zahl der jährlichen Hantavirus-Erkrankungen unterliegt in Deutschland deutlichen Schwankungen; seit Beginn der Meldepflicht 2001 wurden in drei Jahren (2005, 2007 und 2010) ungewöhnlich viele Erkrankungen gemeldet. Während in den übrigen Jahren im Durchschnitt 184,9 Infektionen pro Jahr gemeldet wurden, war die Zahl der Erkrankungen im Jahr 2005 mit 447 Erkrankungen gut doppelt so hoch. Die folgenden Epidemien in den Jahren 2007 und 2010 wiesen mit 1688 bzw. 2016 Erkrankungen sogar noch weit extremere Steigerungen der Fallzahlen auf (Robert-Koch-Institut, SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: 4.2.2011). Da sich die am meisten betroffenen Gebiete (z.B. Schwäbische Alb, Bayerischer Wald) in Epidemie- und nicht-Epidemie-Jahren entsprechen, kann man von einer großen Stabilität der Hantavirus-Naturherde ausgehen (Piechotowski et al., 2008). Der Anstieg der Fallzahlen in einzelnen Jahren wird also nicht durch das Auftreten neuer Naturherde verursacht, sondern durch Veränderungen innerhalb der bestehenden Naturherde, insbesondere der Rötelmauspopulationen.

Die Hauptnahrung der Rötelmäuse stellen Bucheckern dar. Sind diese im Herbst durch eine Buchenmast, die durch hohe Temperaturen und geringe Niederschlagsmengen im Sommer begünstigt wird (Olsson et al., 2010), reichlich vorhanden, so sorgt das gute Nahrungsangebot für eine hohe Überlebensrate der Tiere im folgenden Winter. Daneben wird die Fortpflanzungsperiode im Frühjahr verlängert und, bei besonders günstigen Bedingungen, sogar eine Wintervermehrung ermöglicht, die bei Rötelmäusen im Normalfall nicht vorkommt. Aufgrund dieser Faktoren sind die Rötelmauspopulationen nach Mastjahren bereits im Frühjahr sehr groß (Clement et al., 2009; Olsson et al., 2010). Da die Ausbreitung der Hantaviren innerhalb einer Nagerpopulation bei höherer Populationsdichte erleichtert wird (Olsson et al., 2003), ist bei einer großen Populationsdichte die Hantavirus-Prävalenz der Rötelmäuse im Vergleich zu einer Population mit geringer Dichte deutlich erhöht. Die erhöhte Virusprävalenz und die damit einhergehende starke Virusausscheidung durch infizierte Rötelmäuse hat wiederum ein hohes Infektionsrisiko für die Bevölkerung zur Folge. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Puumala-Virus-Prävalenz in Rötelmäusen im Gebiet Römerstein aus dem Jahr 2007, die mit 57,9% um ein Vielfaches höher lag als im Zeitraum 1997-2000, legt einen Zusammenhang zwischen einer hohen Virusprävalenz und einer hohen Zahl an humanen

Krankheitsfällen nahe. Da es in Deutschland jedoch keine Daten bezüglich der Populationsgrößen der Rötelmäuse innerhalb eines Gebietes gibt (Essbauer et al., 2006), lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die Rötelmauspopulationen im Jahr 2007 in Römerstein und anderen besonders betroffenen Gebieten im Vergleich zu den Vorjahren vergrößert waren.

Neben der Populationsdichte der Rötelmäuse spielt auch die Nähe der Tiere zum Menschen und die damit einhergehende Kontakt- und Infektionsmöglichkeit für die Zahl an Hantavirus-Erkrankungen eine Rolle. In milden Wintern führt das Fehlen der Schneedecke, die den Tieren Schutz vor Fressfeinden und Kälte bietet, dazu, dass Rötelmäuse in der Umgebung menschlicher Behausungen Schutz suchen. Dies erhöht wiederum die Kontaktwahrscheinlichkeit der Menschen mit potentiell infektiösen Ausscheidungen der Nager (Evander und Ahlm, 2009; Olsson et al., 2010).

Die hohe Zahl an Hantavirus-Erkrankungen im Jahr 2007 lässt sich sowohl anhand der klimatischen Verhältnisse als auch der Lebensbedingungen der Rötelmäuse erklären. Aufgrund des warmen, trockenen Sommers 2006 gab es im Herbst desselben Jahres eine Buchenmast und somit reichlich Nahrung für die Rötelmäuse über den folgenden Winter (Meining et al., 2009). Somit kann man von einer großen Populationsdichte der Rötelmäuse im Frühjahr ausgehen, die wiederum zu einer hohen Virusprävalenz und einer großen Zahl an humanen Erkrankungen führte (Piechotowski et al., 2008).

Im Winter 2006/2007 lagen die durchschnittlichen Temperaturen in Süddeutschland um 3,8°C über dem langjährigen Mittelwert, im Januar 2007 war es sogar bis zu 5,5°C wärmer als in den Vorjahren (Piechotowski et al., 2008). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Zahl der Hantavirus-Erkrankungen bereits im Winter 2006/2007 deutlich höher war als in Jahren ohne Hantavirus-Epidemie (Piechotowski et al., 2008). Gleiches wurde in Nordschweden beobachtet, wo im Frühjahr 2007 nach einem sehr milden Winter ebenfalls eine ausgeprägte Hantavirus-Epidemie zu verzeichnen war (Pettersson et al., 2008).

Für Süddeutschland werden in den kommenden Jahren Klimaveränderungen prognostiziert, die zu einer Zunahme der humanen Hantavirus-Infektionen bzw. von Jahren mit Hantavirus-Epidemien führen können.

Aufgrund der prognostizierten milderer Temperaturen im Winter (Gerstengarbe und Werner, 2008) ist mit einem Rückgang der schützenden Schneedecke zu rechnen, was wiederum zu einer größeren Nähe der Rötelmäuse zum Menschen führen kann. Mildere Winter können somit zur Zunahme humaner Hantavirus-Erkrankungen in den Wintermonaten beitragen.

Hohe Temperaturen und geringe Niederschläge im Sommer, wie sie für Süddeutschland vorhergesagt werden (Gerstengarbe und Werner, 2008), begünstigen die Buchenmast, die wiederum zu großen Populationsdichten der Rötelmäuse und infolgedessen zu einer großen Zahl an Hantavirus-Infektionen führt (Olsson et al., 2010). Diese Zusammenhänge wurden in Belgien bereits nachgewiesen (Tersago et al., 2009; Clement et al., 2009). Bei einem Fortschreiten der Klimaveränderungen ist somit in Süddeutschland vermehrt mit Hantavirus-Epidemien in Folge von Buchenmastjahren zu rechnen.

5. Zusammenfassung

Zoonosen, d.h. von Tieren auf den Menschen übertragene Erkrankungen, spielen in der Humanmedizin eine wichtige Rolle. Um die Gefährdung des Menschen durch zecken- und nagerassoziierte Infektionskrankheiten einschätzen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, deren Verbreitung und Häufigkeit zu kennen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Epidemiologie einiger humanpathogener Krankheitserreger (*Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., FSME-Viren und Hantaviren) in Süddeutschland untersucht. Dabei wurde auch die Rolle von klimatischen Veränderungen in der Epidemiologie dieser Infektionserreger berücksichtigt, da das Klima als abiotischer Faktor großen Einfluss auf Zecken und Nager und damit auch auf die Naturherde der Erreger hat.

Im Fall von *Coxiella burnetii*, dem Erreger des Q-Fiebers, ist die epidemiologische Bedeutung von Naturherden in Deutschland bisher weitgehend unbekannt. Daher wurden Zecken der Gattung *Dermacentor* sowie Nager aus Q-Fieber-Endemiegebieten auf Infektionen mit *C. burnetii* untersucht. Die molekularbiologische Untersuchung von insgesamt 1120 Zecken sowie 119 Nagern zeigte in keinem Fall Infektionen mit dem Erreger. Auch bei der zusätzlich durchgeführten serologischen Untersuchung der Nager erwiesen sich alle Tiere als negativ. In den Untersuchungsgebieten wurden somit keine Q-Fieber-Naturherde nachgewiesen, sodass eine entscheidende Bedeutung von Naturherden in der Q-Fieber-Epidemiologie in Süddeutschland sehr unwahrscheinlich ist.

Dermacentor marginatus und *D. reticulatus* fungieren als Vektoren verschiedener Rickettsienarten. Um zu überprüfen, ob in Süddeutschland humanpathogene Rickettsien verbreitet sind, wurden *Dermacentor*-Zecken aus verschiedenen Gebieten auf Infektionen untersucht. Da bisher nicht bekannt ist, welche Tiere den Rickettsien als Reservoirwirte dienen, wurden darüber hinaus Nager aus denselben und zusätzlichen Untersuchungsgebieten molekularbiologisch und serologisch untersucht. Unter 1120 Zecken lag die Gesamtprävalenz von *Rickettsia* spp. bei 33,6%. Die Identifizierung der Erreger mittels Sequenzierung des *rOmpA*-Gens ergab eine Befallsrate von 32,8% für *R. raoultii* und 0,8% für *R. slovaca*. Beide Arten gelten als humanpathogen, sodass von einem Infektionsrisiko für den Menschen

ausgegangen werden muss. Dies wurde durch den Nachweis einer autochthonen *R. slovaca*-Infektion in Rheinland-Pfalz belegt.

Bei der molekularbiologischen Untersuchung von 238 Nagerorganen wurden keine Rickettsien nachgewiesen, wohingegen 48 Tiere (20,2%) Antikörper gegen *Rickettsia* spp. aufwiesen. Infektionen wurden sowohl bei Muriden als auch bei Arvicoliden festgestellt. Somit wurde gezeigt, dass Nager als Reservoirwirte für Rickettsien fungieren können.

Um die aktuelle Prävalenz von FSME-Viren in Zecken zu ermitteln, wurden 7842 *I. ricinus* aus mehreren Regionen in Baden-Württemberg molekularbiologisch untersucht. In vier von 11 Untersuchungsgebieten wurden FSME-Viren nachgewiesen; die Prävalenzen lagen bei 0,13% im Bodenseekreis (Hödingen Tobel und Hagnau am Bodensee), 0,13% in Stuttgart-Botnang und 0,66% in Gengenbach. In den übrigen Untersuchungsgebieten wurden keine mit FSME-Viren infizierten Zecken detektiert. Im Vergleich zu Studien aus den 1990er Jahren sind die Virusbefallsraten in allen untersuchten Gebieten gesunken; aussagekräftige Vergleiche sind jedoch aufgrund der sehr geringen Zahl infizierter Zecken kaum möglich.

Die FSME-Viren der Zecken aus Gengenbach, Hagnau am Bodensee und dem Hödingen Tobel wurden auf Zellkultur vermehrt und durch Sequenzierung des E-Gens und des NS2a-Gens sowie phylogenetische Analysen charakterisiert, um die in Baden-Württemberg zirkulierenden Virusstämme zu erfassen. Das Virusisolat aus Hagnau am Bodensee wurde eindeutig als Virusstamm Salem identifiziert, wohingegen sich die Isolate aus den beiden anderen Gebieten stark von allen bisher in der Genbank vorhandenen Virusstämmen unterschieden, sodass keine eindeutige Zuordnung möglich war.

Die Zahl der gemeldeten Hantavirus-Erkrankungen im Jahr 2007 überstieg bei weitem die durchschnittliche Erkrankungszahl der Vorjahre. Um zu überprüfen, ob die Zunahme humaner Infektionen mit einer ungewöhnlich hohen Virus-Prävalenz der Reservoirwirte im selben Zeitraum einherging, wurden Rötelmäuse von der Schwäbischen Alb, einem Hochendemiegebiet, molekularbiologisch und serologisch auf Infektionen untersucht. Dabei ergab sich im Gebiet Römerstein/Wiesensteig eine Gesamtprävalenz von 57,9%. Verglichen mit den Ergebnissen einer Studie von

2001, in der eine durchschnittliche Prävalenz von 10% ermittelt wurde, entspricht dieser Wert einer fast sechsfachen Steigerung und spiegelt damit die enorme Erkrankungszahl im Untersuchungsjahr wider. Sequenzvergleiche ergaben eine enge Verwandtschaft zwischen den Hantaviren aus diesem Gebiet und anderen in Baden-Württemberg detektierten Viren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern die Grundlage für weitere, kontinuierliche Untersuchungen. Diese sind nötig, um den Einfluss des Klimawandels auf die hier behandelten Zoonosen und damit die Entwicklung des Infektionsrisikos für den Menschen beurteilen zu können.

6. Summary

Zoonoses, which are defined as human infections caused by animal pathogens, are of considerable medical importance. Therefore, it is important to evaluate the distribution of tick- and rodent borne pathogens and the risk of infections for humans. Hence, the epidemiology of specific human pathogens (*Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., TBE-virus and Hantavirus) was studied. As climatic conditions are known to have a significant influence on ticks and rodents, the role of climate change in the epidemiology of the examined pathogens was considered.

The role of natural foci in the epidemiology of *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever, is widely unknown in Germany. Therefore, ticks of the genus *Dermacentor* and rodents from Q fever endemic areas in Southern Germany were examined for infections with *C. burnetii*. Altogether, 1120 ticks and 119 rodents were tested by PCR. However, no infections were detected. Rodent blood samples were additionally tested for antibodies against coxiellae, but likewise, all samples were found to be negative. Hence, no natural foci of Q fever were identified in the examined areas. A role of natural foci in the epidemiology of Q fever in Southern Germany is therefore unlikely.

Both *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* act as vectors for *Rickettsia* spp. To elucidate if human pathogenic rickettsiae are distributed in Southern Germany, *Dermacentor* ticks were investigated for infections by PCR. Moreover, rodents were screened by molecular and serological methods to identify potential reservoir hosts. The overall prevalence of *Rickettsia* spp. in 1120 ticks was 33.6%. By sequencing of the *rOmpA*-gene, *R. raoultii* was identified in 32.8% and *R. slovaca* in 0.8% of all examined ticks. Both species are pathogenic for humans; thus, there might be a considerable risk of infection. This was confirmed by the detection of an autochthonous case of *R. slovaca*-infection in Rhineland-Palatinate.

Rickettsia spp. was not detected in any rodents by PCR. However, 48 animals (20.2%), muridae as well as arvicolidae, showed antibodies against rickettsiae. It was, therefore, shown that rodents can actually act as reservoir hosts for *Rickettsia* spp.

To determine the current prevalence of TBE virus in ticks, 7842 *Ixodes ricinus* from several regions in Baden-Württemberg were examined by molecular methods. TBE virus was found in four out of 11 examined areas. Prevalences were 0.13% in the district Bodenseekreis (Hödingen Tobel und Hagnau am Bodensee), 0.13% in Stuttgart-Botnang and 0.66% in Gengenbach. No infected ticks were found in other areas. The determined prevalences were lower compared to studies from the 1990ies in the same areas. However, reliable comparisons are difficult due to the low number of infected ticks.

The viruses of ticks from Gengenbach, Hagnau am Bodensee and Hödingen Tobel were cultured and subsequently characterized by sequencing of the E and NS2a genes. Phylogenetic studies were conducted to identify the TBE virus strains present in Baden-Württemberg. The isolate from Hagnau am Bodensee was identified as strain Salem, whereas the isolates of the other two areas differed substantially from all strains found in the database. Therefore, no identification was possible for these isolates.

In 2007, the number of notified hantavirus infections exceeded by far the average case numbers of the preceding years. To determine if the steep rise in human infections is associated with an unusual high virus prevalence in reservoir hosts, red bank voles from the endemic area of the Swabian Albs were examined for infections by molecular and serological methods. The overall prevalence of Puumala hantavirus was 57.9%. In a study in 2001 in the same area, the prevalence was only 10%. Therefore, there was a sixfold rise in virus prevalence which reflects the high number of human cases in the study year. Sequence comparisons showed a close relationship of the hantaviruses from the Swabian Alb to hantaviruses detected in other areas of Baden-Württemberg.

The results presented in this study provide the basis for further continuous studies. These are necessary to estimate the actual influence of changes in climate conditions on the examined zoonoses and, thereby, the prospective infection risk for humans.

7. Literatur

- ARMENGAUD A, KESSALIS N, DESENCLOS JC, MAILLOT E, BROUSSE P, BROUQUI P, TIXIER-DUPONT H, RAOULT D; PROVENSAL P, OBADIA Y (1997): Urban outbreak of Q fever, Briançon, France, March to June 1996. *Euro Surveill* 2(2), pii=137.
- ARRICAU-BOUVERY N UND RODOLAKIS A (2005): Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res* 36, 327-349.
- ASTOBIZA I, BARRAL M, RUIZ-FONS F, BARANDIKA JF, GERRIKAGOITIA X, HURTADO A, GARCIA-PEREZ AL (2011): Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area. *Vet Microbiol* 147(1-2), 190-194.
- AUGOT D, SAUVAGE F, BOUE F, BOULOY M, ARTOIS M, DEMERSON JM, COMBES B, COUDRIER D, ZELLER H, CLIQUET F, PONTIER D (2008): Spatial and temporal patterning of bank vole demography and the epidemiology of the Puumala hantavirus in northeastern France. *Epidemiol Infect* 136, 1638-1643.
- AZAD AF UND BEARD CB (1998): Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis* 4(2), 179-186.
- BAKHVALOVA V, DOBROTVORSKY AK, PANOV VV, MATVEEVA VA, TKACHEV SE, MOROZOVA OV (2006): Natural tick-borne encephalitis virus infection among wild small mammals in the southeastern part of western Siberia, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6(1), 32-41.
- BALASHOV YU (1997): Distribution of ixodid ticks (Acarina, Ixodidae) over landscapes within their ranges in Russia. *Entomol Rev* 77(5), 625-637.
- BAMBERG WM, PAPE JW, BEEBE JL, NEVIN-WOODS C, RAY W, MAGUIRE H, NUCCI J, MASSUNG RF, GERSHMAN K (2007): Outbreak of Q fever associated with a horse-boarding ranch, Colorado, 2005. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(3), 394-402.
- BARANDIKA JF, HURTADO A, GARCIA-ESTEBAN C, GIL H, ESCUDERO R, BARRAL M, JADO I, JUSTA RA, ANDA P, GARCIA-PEREZ AL (2007): Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl Environ Microbiol* 73(19), 6166-6171.
- BARANDIKA JF, HURTADO A, GARCIA-SANMARTIN J, JUSTE RA, ANDA P, GARCIA-PEREZ AL (2008): Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(6), 829-835.
- BOOM R, SOL CJA, SALIMANS MMM, JANSEN CL, WERTHEIM-VAN DILLEN PME, VAN DER NOORDA J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28(3), 495-503.
- BOWEN MD, GELBMANN W, KSIAZEK TG, NICHOL ST, NOWOTNY N (1997): Puumala virus and two genetic variants of tula virus are present in Austrian rodents. *J Med Virol* 53(2), 174-181.

- BRINKLEY C, NOLSKOG P, GOLOVLJOVA I, LUNDKVIST A, BERGSTRÖM T (2008):** Tick-borne encephalitis virus natural foci emerge in western Sweden. *Int J Med Microbiol* 298 S1, 73-80.
- BROCKMANN SO, WAGNER-WIENING C et al. (2009):** Deskription und räumlich-statistische Analyse von Q-Fieber Erkrankungen in Baden-Württemberg mit Unterstützung von Geographischen Informationssystemen. *Abschlussbericht (Fördernummer Robert-Koch Institut, FKZ 1369-344)*.
- BROUQUI P, FENOLLAR F, BARANTON G, BIRTLES RJ, BJOERSDORFF A, BLANCO JR, CARUSO G, CINCO M, FOURNIER PE, FRANCAVILLA E, JENSENIUS M, KAZAR J, LAFERL H, LAKOS A, LOTRIC FURLAN S, MAURIN M, OTEO JA, PAROLA P, PEREZ-EID C, PETER O, POSTIC D, RAOULT D, TELLEZ A, TSELENTIS Y, WILSKE B (2004):** Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 10(12), 1108-1132.
- BURGDORFER W, AESCHLIMANN A, PETER O, HAYES SF, PHILIP RN (1979):** *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Tropica* 36(4), 357-367.
- BURKHARDT JF UND SCHLUND W (2005):** Rötelmaus *Clethrionomys glareolus*. In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 289-296. ISBN: 3-8001-4246-5.
- CAPO C, LINDBERG FP, MECONI S, ZAFFRAN Y, TAREI G, BROWN EJ, RAOULT D, MEGE JL (1999):** Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between $\alpha_v\beta_3$ integrin and CR3. *J Immunol* 163(11), 6078-6085.
- CARCOPINO X, RAOULT D, BRETELLE F, BOUBLI L, STEIN A (2009):** Q fever during pregnancy: a cause of poor fetal and maternal outcome. *Ann N Y Acad Sci* 1166, 79-89.
- CARPI G, BERTOLOTTI L, ROSATI S, RIZZOLI A (2009):** Prevalence and genetic variability of tick-borne encephalitis virus in host-seeking *Ixodes ricinus* in northern Italy. *J Gen Virol* 90, 2877-2883.
- CASATI S, GERN L, PIFFARETTI JC (2006):** Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (canton Bern). *J Gen Virol* 87, 2235-2241.
- CASTILLO L, FERNANDEZ-LLARIO P, ALMANSA JC, BERMEJO F, DE MENDOZA JH (2010):** First seropositive case of *Coxiella burnetii* in red deer populations in the southwest Iberian peninsula. *J Zoo Wildl Med* 41(3), 468-473.
- CAZORLA C, ENEA M, LUCHT F, RAOULT D (2003):** First isolation of *Rickettsia slovaca* from a patient, France. *Emerg Infect Dis* 9(1), 135.
- CLEMENT J, VERCAUTEREN J, VERSTRAETEN WW, DUCOFFRE G, BARRIOS JM, VANDAMME AM, MAES P, VAN RANST M (2009):** Relating increasing hantavirus incidences to the changing climate: the mast connection. *Int J Health Geogr* 8(1).
- CUTLER SJ, BOUZID M, CUTLER RR (2007):** Q fever. *J Infect* 54(4), 313-318.

- D'AGARO P, MARTINELLI E, BURGNICH P, NAZZI F, DEL FABBRO S, IOB A, RUSCIO M, PISCHIUTTI P, CAMPELLO C (2009):** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* from a novel endemic area of north eastern Italy. *J Med Virol* 81(2), 309-316.
- DANIEL M, DANIELOVA V, KRIZ B, KOTT I (2004):** An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 55-62.
- 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.
- DANIELOVA V, RUDENKO N, DANIEL M, HOLUBOVA J, MATERNA J, GOLOVCHENKO M, SCHWARZOVA L (2006):** Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 296 S1, 48-53.
- DAUTEL H, DIPPEL C, OEHME R, HARTELT K, SCHETTLER E (2006):** Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int J Med Microbiol* 296 S1, 149-156.
- DAUTEL H, DIPPEL C, KÄMMER D, WERKHAUSEN A, KAHL O (2008):** Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int J Med Microbiol* 298 S1, 50-54.
- DEKONENKO A, YAKIMENKO V, IVANOV A, MOROZOV V, NIKITIN P, KHASANOVA S, DZAGUROVA T, TKACHENKO E, SCHMALJOHN C (2003):** Genetic similarity of Puumala viruses found in Finland and western Siberia and of the mitochondrial DNA of their rodent hosts suggests a common evolutionary origin. *Infect Genet Evol* 3(4), 245-257.
- DENMAN J UND WOODS M (2009):** Acute Q fever in pregnancy: report and literature review. *Intern Med J* 39(7), 479-481.
- DERRICK EH (1944):** The epidemiology of Q fever. *J Hyg (Lond)* 43(5), 357-361.
- DEZFULI M (2006):** Untersuchung zur Epidemiologie von Coxiellen und Rickettsien in *Dermacentor* Zecken. *Diplomarbeit aus der Fakultät Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.
- DIETERLEN F (2005a):** Feldmaus *Microtus arvalis*. In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 297-311. ISBN: 3-8001-4246-5.
- DIETERLEN F (2005b):** Ordnung Nagetiere (Rodentia). In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 143-152. ISBN: 3-8001-4246-5.

- DIETERLEN F (2005c):** Schermaus (Ostschermaus, Große Wühlmaus) *Arvicola terrestris*. In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 328-341. ISBN: 3-8001-4246-5.
- DOBEC M, GOLUBIC D, PUNDA-POLIC V, KAEPELI F, SIEVERS M (2009):** *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerg Infect Dis* 15(1), 98-100.
- DOBLER G UND WÖLFEL R (2009):** Fleckfieber und andere Rickettsiosen. *Dtsch Ärztebl* 106(29), 348-354.
- DÖRR B UND GOTHE R (2001):** Cold-hardiness of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 25(2), 151-169.
- DUMPIS U, CROOK D, OKSI J (1999):** Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 28, 882-890.
- EASTERBROOK JD UND KLEIN SL (2008):** Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *PLoS Pathogens* 4(11), e1000172.
- ERNST E (2000):** Genetischer und serologischer Nachweis von Hantaviren (*Bunyaviridae*) in Schermäusen (*Arvicola terrestris*) aus Baden-Württemberg. *Diplomarbeit aus dem Fakultät Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*.
- ESSBAUER S, SCHMIDT J, CONRATHS FJ, FRIEDRICH R, KOCH J, HAUTMANN W, PFEFFER M, WÖLFEL R, FINKE J, DOBLER G, ULRICH R (2006):** A new Puumala hantavirus subtype in rodents associated with an outbreak of nephropathia epidemica in south-east Germany in 2004. *Epidemiol Infect* 134(6), 1333-1344.
- ESSBAUER SS, SCHMIDT-CHANASIT J, MADEJA EL, WEGENER W, FRIEDRICH R, PETRAITYTE R, SASNAUSKAS K, JACOB J, KOCH J, DOBLER G, CONRATHS FJ, PFEFFER M, PITRA C, ULRICH RG (2007):** Nephropathia epidemica in metropolitan area, Germany. *Emerg Infect Dis* 13(8), 1271-1273.
- ESSBAUER S, JACOB J, ULRICH RG (2008):** Klima, Nagetiere und Nagetier-assoziierte Krankheitserreger. In: Lozan JL et al. (Hrsg.): *Warnsignal Klima - Gesundheitsrisiken. Wissenschaftliche Auswertungen*, S. 242-246. ISBN 978-39809668-4-9.
- EVANDER M, ERIKSSON I, PETTERSSON L, JUTO P, AHLM C, OLSSON GE, BUCHT G, ALLARD A (2007):** Puumala hantavirus viremia diagnosed by real-time reverse transcriptase PCR using samples from patients with hemorrhagic fever and renal syndrome. *J Clin Microbiol* 45(8), 2491-2497.
- EVANDER M UND AHLM C (2009):** Milder winters in northern Scandinavia may contribute to larger outbreaks of haemorrhagic fever virus. *Glob Health Action* 2.
- FABER MS, ULRICH RG, FRANK C, BROCKMANN SO, PFAFF GM, JACOB J, KRÜGER DH, STARK K (2010):** Steep rise in notified hantavirus infections in Germany, April 2010. *Euro Surveill* 15(20), pii=19574.

- FAULDE M, SOBE D, KIMMIG P, SCHARNINGHAUSEN J (2000):** Renal failure and hantavirus infection in europe. *Nephrol Dial Transplant* 15(6), 751-753.
- FELSENSTEIN J (1989):** PHYLIP – phylogeny interference package. *Cladistics* 5, 164-166.
- FIGUEIREDO LTM, MORELI ML, BORGES AA, FIGUEIREDO GG, SOUZA RLM, AQUINO VH (2008):** Expression of a hantavirus N protein and its efficacy as antigen in immune assays. *Braz J Med Biol Res* 41(7), 596-599.
- FISCHER SF, STING R, BÜRSTEL D (2010):** Leitlinien zum Q-Fieber - Maßnahmen im Falle des Auftretens von Q-Fieber. *Amtstierärztlicher Dienst und Lebensmittelkontrolle*, 17(2), 116-118.
- FOURNIER PE, MARRIE TJ, RAOULT D (1998):** Diagnosis of Q Fever. *J Clin Microbiol* 36(7), 1823-1834.
- FOURNIER PE, GRUNNENBERGER F, JAULHAC B, GASTINGER G, RAOULT D (2000):** Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis* 6(4), 389-392.
- FOURNIER PE UND RAOULT D (2003):** Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microbiol* 41(11), 5094-5098.
- FOURNIER PE, ALLOMBERT C, SUPPUTAMONGKOL Y, CARUSO G, BROUQUI P, RAOULT D (2004):** Aneuptic fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol* 42(2), 816-818.
- GARCIA-PEREZ AL, ASTOBIZA I, BARANDIKA JF, ATXAERANDIO R, HURTADO A, JUSTE RA (2009):** Investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. *J Dairy Sci* 92, 1581-1584.
- GÄUMANN R, MÜHLEMANN K, STRASSER M, BEURET CM (2010):** High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 76(13), 4241-4249.
- GERSTENGARBE FW UND WERNER PC (2008):** Climate development in the last century - global and regional. *Int J Med Microbiol* 298 S1, 5-11.
- GILLES J, JUST FT, SILAGHI C, PRADEL I, PASSOS LMF, LENGAUER H, HELLMANN K, PFISTER K (2008):** *Rickettsia felis* in fleas, Germany. *Emerg Infect Dis* 14(8), 1294-1296.
- GILLESPIE JJ, BEIER MS, RAHMAN MS, AMMERMAN NC, SHALLOM JM, PURKAYASTHA A, SOBRAL BS, AZAD AF (2007):** Plasmids and rickettsial evolution: insights from *Rickettsia felis*. *PLoS One* 2(3), e266.
- GILSDORF A, KROH C, GRIMM S, JENSEN E, WAGNER-WIENING C, ALPERS K (2008):** Large Q fever outbreak due to sheep farming near residential areas, Germany, 2005. *Epidemiol Infect* 136, 1084-1087.

- GRARD G, MOUREAU G, CHARREL RN, LEMASSON JJ, GONZALEZ JP, GALLIAN P, GRITSUN TS, HOLMES EC, GOULD EA, DE LAMBALLERIE X (2007):** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 361(1), 80-92.
- GRAY JS, DAUTEL H, ESTRADA-PENA A, KAHL O, LINDGREN E (2009):** Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis ID*: 593232.
- GREENSLADE E, BEASLEY R, JENNINGS L, WOODWARD A, WEINSTEIN P (2003):** Has *Coxiella burnetii* (Q fever) been introduced into New Zealand? *Emerg Infect Dis* 9(1), 138-140.
- GRILC E, SOCAN M, KOREN N, UCAKAR V, AVSIC T, POGACNIK M, KRAIGHER A (2007):** Outbreak of Q fever among a group of high school students in Slovenia, March-April 2007. *Euro Surveill* 12(7), E070719.1.
- HAGLUND M, VENE S, FORSGREN M, GÜNTHER G, JOHANSSON B, NIEDRIG M, PLYUSNIN A, LINDQUIST L, LUNDKVIST A (2003):** Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *J Med Virol* 71(4), 610-621.
- HALL TA (1999):** BioEdit. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series* 41, 95-98.
- HAN X, AHO M, VENE S, PELTOMAA M, VAHERI A, VAPALAHTI O (2001):** Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Finland. *J Med Virol* 64(1), 21-28.
- HAN X, JUCEVICIENE A, UZCATEGUI NY, BRUMMER-KORVENKONTIO H, ZYGUTIENE M, JÄÄSKELÄINEN A, LEINIKKI P, VAPALAHTI O (2005):** Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks in Lithuania. *J Med Virol* 77(2), 249-256.
- HARTELT K, OEHME R, FRANK H, BROCKMANN O, HASSLER D, KIMMIG P (2003):** Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 86-92.
- HARTELT K (2004):** Epidemiologie Arthropoden-übertragener Infektionen in Baden-Württemberg: *Anaplasma* sp. (*Ehrlichia* spp.), *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., Coltivirus, FSME-Virus, *Borrelia* spp. *Dissertation aus dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*.
- HATCHETTE TF, HUDSON RC, SCHLECH WF, CAMPBELL NA, HATCHETTE JE, RATNAM S, RAOULT D, DONOVAN C, MARRIE TJ (2001):** Goat-associated Q fever: a new disease in Newfoundland. *Emerg Infect Dis* 7(3), 413-419.

- HEINZEN RA, SCIDMORE MA, ROCKERY DD, HACKSTADT T (1996):** Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 64(3), 796-809.
- HEISKE A, ANHEIER B, PILASKI J, VOLCHKOV VE, FELDMANN H (1999):** A new *Clethrionomys*-derived hantavirus from Germany: evidence for distinct genetic sublineages of Puumala viruses in Western Europe. *Virus Res* 61(2), 101-112.
- HELLENBRAND W, BREUER T, PETERSEN L (2001):** Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. *Emerg Infect Dis* 7(5), 789-796.
- HEYMAN P, VAN MELE R, SMAJLOVIC L, DOBLY A, COCHEZ C, VANDENVELDE C (2009):** Association between habitat and prevalence of hantavirus infection in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 9(2), 141-146.
- HIEPE T, LUCIUS R, GOTTSTEIN B (2006):** Allgemeine Parasitologie. Parey Verlag, 1. Auflage. ISBN: 3-8304-4101-0.
- HILBINK F, PENROSE M, KOVACOVA E, KAZAR J (1993):** Q fever is absent from New Zealand. *Int J Epidemiol* 22(5), 945-949.
- HILLYARD PD (1996):** Ticks of North-West Europe. In: Barnes RSK, Crothers JH (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series)*, Nr. 52. ISBN 1-85153-257-9.
- HOFMANN J, MEISEL H, KLEMPA B, VESENBECK SM, BECK R, MICHEL D, SCHMIDT-CHANASIT J, ULRICH R, GRUND S, ENDERS G, KRUGER D (2008):** Hantavirus outbreak, Germany, 2007. *Emerg Infect Dis* 14(5), 850-852.
- HOWE D UND MALLAVIA LP (2000):** *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. *Infect Immun* 68(7), 3815-3821.
- JAHN F (2009):** Epidemiologische Untersuchungen zur Prävalenz von FSME-Viren in *Ixodes ricinus* in Baden-Württemberg. *Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*.
- JANSEN A, LA SCOLA B, RAOULT D, LIERZ M, WICHMANN O, STARK K, SCHNEIDER T (2008):** Antibodies against *Rickettsia* spp. in hunters, Germany. *Emerg Infect Dis* 14(12), 196-1963.
- KAHL O UND DAUTEL H (2008):** Zur Biologie und Ökologie von Zecken und ihre Ausbreitung nach Norden. In: Lozan JL et al. (Hrsg.): *Warnsignal Klima - Gesundheitsrisiken. Wissenschaftliche Auswertungen*, S.215-218. ISBN 978-39809668-4-9.
- KAISER R (1999):** The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98. *Brain* 122, 2067-2078.

- KANERVA M, MUSTONEN J, VAHERI A (1998):** Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* 8(2), 67-86.
- KAZAR J (2005):** *Coxiella burnetii* infection. *Ann N Y Acad Sci* 1063, 105-114.
- KENNERMAN E, ROUSSET E, GÖLCÜ E, DUFOUR P (2010):** Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the southern Marmara region, Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 33(1), 37-45.
- KIFFNER C ZUCCHINI W, SCHOMAKER P, VOR T, HAGEDORN P, NIEDRIG M, RÜHE F (2010):** Determinants of tick-borne encephalitis in counties of Germany, 2001-2008. *Int J Health Geogr* 9(42).
- KIMMIG P, HASSLER D, BRAUN R (2001a):** Zecken. Kleiner Stich mit bösen Folgen. *Ratgeber Ehrenwirth Lübbe*, 3. Auflage. ISBN 3-431-04018-7.
- KIMMIG P, SILVA-GONZALEZ R, BACKE H, BROCKMANN S, OEHME R, ERNST E, MACKENSTEDT U (2001b)** Epidemiologie von Hantaviren in Baden-Württemberg. *Gesundheitswesen* 63, 107-112.
- KIMMIG P UND WAGNER-WIENING C (2009):** *Coxiella burnetii*. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.): *Mikrobiologische Diagnostik*, S. 628-362. Thieme Verlag, 2. Auflage. ISBN 978-3-13-743602-7.
- KIMMIG P, PLUTA S, NAUCKE T (2010):** Globale Erwärmung: Infektionsgefahr aus dem Süden. *Biologie in unserer Zeit* 40(1), 21-28.
- 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.
- KLEMPA B, MEISEL H, RÄTH S, BARTEL J, ULRICH R, KRÜGER DH (2003):** Occurrence of renal and pulmonary syndrome in a region of north-eastern Germany where Tula hantavirus circulates. *J Clin Microbiol* 41(10), 4894-4897.
- KLEMPA B (2009):** Hantaviruses and climate change. *Clin Microbiol Infect* 15(6), 518-523.
- KLINGSTRÖM J, HEYMAN P, ESCUTENAIRE S, SJÖLANDER KB, DEJAEGERE F, HENTTONEN H (2002):** Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol* 68(4), 581-588.
- KRÜGER DH (2009):** Hantaviren. In: Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.): *Mikrobiologische Diagnostik*, S. 953-958. Thieme Verlag, 2. Auflage. ISBN 978-3-13-743602-7.

- KUPCA AM, ESSBAUER S, ZÖLLER G, DE MENDONCA PG, BREY R, RINDER M, PFISTER K, SPIEGEL M, DÖRRBECKER B, PFEFFER M, DOBLER G (2010):** Isolation and molecular characterization of a tick-borne encephalitis virus strain from a new tick-borne encephalitis focus with severe cases in Bavaria, Germany. *Ticks Tick-borne Dis* 1(1), 44-51.
- LA SCOLA B UND RAOULT D (1997):** Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 35(11), 2715-2727.
- LABUDA M, AUSTYN JM, ZUFFOVA E, KOZUCH O, FUCHSBERGER N, LYSY J, NUTTALL PA (1996):** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219, 357-366.
- LAKOS A (1997):** Tick-borne lymphadenopathy - a new rickettsial disease? *Lancet* 350(9083), 1006.
- LAKOS A (2002):** Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). *Wien Klin Wochenschr* 114(13-14), 648-654.
- LEDNICKY, JA (2003):** Hantaviruses - a short review. *Arch Pathol Lab Med* 127(1), 30-35.
- LEE HW, LEE PW, JOHNSON KM (1978):** Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, 1978. *J Infect Dis* 137(3), 298-308.
- LELAND DS UND GINOCCHIO CC (2007):** Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 20(1), 49-78.
- LEYSEN P, DE CLERCQ E, NEYTS J (2000):** Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Clin Microbiol Rev* 13(1), 67-82.
- LIEBISCH A UND RAHMAN MS (1976):** Zum Vorkommen und zur vektoriellen Bedeutung der Zecken *Dermacentor marginatus* und *D. reticulatus* in Deutschland. *Tropenmed Parasit* 27(4), 393-404.
- LIEBISCH A (1977):** Das Q-Fieber als Naturherdinfektion in Süddeutschland. *Bundesgesundheitsblatt* 20(14), 185-191.
- LIEBISCH A (1991):** Biologie und Ökologie der Zecken. In: Horst H (Hrsg.): *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier*, S. 31-47. *Perimed Fachbuch-Verlagsgesellschaft*. ISBN: 3884293745.
- LINDGREN E (1998):** Climate and tickborne encephalitis. *Cons Ecol Online* 2(1), 1-14.
- LINDGREN E, TÄLLEKLINT L, POLFELDT T (2000):** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting european tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 108(2), 119-123.
- LINDL T (2002):** Zell- und Gewebekultur. *Spektrum Akademischer Verlag*, 5. Auflage. ISBN 3-8274-1194-7.

- LINDQUIST L UND VAPALAHTI O (2008):** Tick-borne encephalitis. *Lancet* 371, 1861-1871.
- LUCIUS R UND LOOS-FRANK B (2008):** Biologie von Parasiten. *Springer Verlag*, 2. Ausgabe. ISBN: 978-3-540-37707-8.
- LUNDKVIST K, VENE S, GOLOVLJOVA I, MAVTCHOUTKO V, FORSGREN M, KALNINA V, PLYUSNIN A (2001):** Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *J Med Virol* 65(4), 730-735.
- LYYTIKÄINEN O, ZIESE T, SCHWARTLÄNDER B, MATZDORFF P, HUNNEN C, BURGER C, KRUG W, PETERSEN L (1997):** Outbreak of Q fever in Lohra-Rollshausen, Germany, spring 1996. *Euro Surveill* 2(2), pii=136.
- MADARIAGA MG, REZAI K, TRENHOLME GM, WEINSTEIN RA (2003):** Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis* 3(11), 709-721.
- 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.
- MARMION B (2007):** Q fever: the long journey to control by vaccination. *Med J Aust* 186(4), 164-166.
- MARQUEZ FJ, ROJAS A, IBARRA V, CANTERO A, ROJAS J, OTEO JA, MUNIAIN MA (2006):** Prevalence data of *Rickettsia slovaca* and other SFG rickettsiae in *Dermacentor marginatus* in the southeastern Iberian peninsula. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 328-330.
- MARRIE TJ, EMBIL J, YATES L (1993):** Seroepidemiology of *Coxiella burnetii* among wildlife in Nova Scotia. *Am J Trop Med Hyg* 49(5), 613-615.
- MARTINEZ JJ UND COSSART P (2004):** Early signaling events involved in the entry of *Rickettsia conorii* into mammalian cells. *J Cell Sci* 117(Pt 21), 5097-5106.
- MAURIN M UND RAOULT D (1999):** Q Fever. *Clin Microbiol Rev* 12(4), 518-553.
- MCCAUGHEY C, MURRAY LJ, MCKENNA JP, MENZIES FD, MCCULLOUGH SJ, O'NEILL HJ, WYATT DE, CARDWELL CR, COYLE PV (2010):** *Coxiella burnetii* (Q fever) seroprevalence in cattle. *Epidemiol Infect* 138, 21-27.
- MEDIANNIKOV O, MATSUMOTO K, SAMOYLENKO I, DRANCOURT M, ROUX V, RYDKINA E, BAVOUST B, TARASEVICH I, BROUQUI P, FOURNIER PE (2008):** *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 7), 1635-1639.
- MEHLHORN H UND PIEKARSKI G (2002):** Grundriss der Parasitenkunde. *Spektrum Akademischer Verlag*, 6. Auflage. ISBN 3-8274-1158-0.

- MEINING S, VON WILPERT K, SCHRÖTER H, SCHÄFFER J, MORGENSTERN Y, ZIRLEWAGEN D (2009):** Waldzustandsbericht 2009 der forstlichen Versuchs- und Forschungsanstalt Baden-Württemberg. Abrufbar unter <http://www.fva-bw.de/publikationen/wzb/ws2009.pdf>.
- MENN B, LORENTZ S, NAUCKE TJ (2010):** Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* 3, 34.
- MODROW S, FALKE D, TRUYEN U, SCHÄTZL H (2010):** Bunyaviren. In: *Molekulare Virologie*, S. 338-348. Spektrum Akademischer Verlag, 3. Auflage. ISBN 978-3-8274-1833-3.
- NIJHOF AM, BODAAN C, POSTIGO M, NIEUWENHUJS H, PSTEEGH M, FRANSSEN L, JEBBINK F, JONGEJAN F (2007):** Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(4), 585-595.
- NILSSON K, LINDQUIST O, LIU AJ, JAENSON TGT, FRIMAN G, PAHLSON C (1999a):** *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol* 37(2), 400-403.
- NILSSON K, LINDQUIST O, PAHLSON C (1999b):** Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354(9185), 1169-1173.
- NILSSON K, ELFVIG K, PAHLSON C (2010):** *Rickettsia helvetica* in patient with Meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis* 16(3), 490-492.
- 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.
- OLSSON GE, AHLM C, ELGH F, VERLEMYR A, WHITE N, JUTO P, PALO RT (2003):** Hantavirus antibody occurrence in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) during a vole population cycle. *J Wildl Dis* 39(2), 299-305.
- OLSSON GE, LEIRS H, HENTTONEN H (2010):** Hantaviruses and their hosts in Europe: Reservoirs here and there, but not everywhere? *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(6), 549-561.
- ORTUNO A, QUESADA M, LOPEZ S, MIRET J, CARDENOSA N, CASTELLA J, ANTON E, SEGURA F (2006):** Prevalence of *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks removed from wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 324-327.
- ORTUNO A, QUESADA M, LOPEZ-CLAESSENS S, CASTELLA J, SAMFELIU I, ANTON E, SEGURA-PORTA F (2007):** The role of wild boar (*Sus scrofa*) in the eco-epidemiology of *Rickettsia slovaca* in northeastern Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(1), 59-64.
- PADULA PJ, EDELSTEIN A, MIGUEL SD, LOPEZ NM, ROSSI CM, RABINOVICH RD (1998):** Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology* 241(2), 323-330.

- PANAIOV S, CICOZZI M, BRANKOVA N, LEVTEROVA V, MITOVA-TIHOLOVA M, AMICOSANTE M, REZZA G, KANTARDJIEV T (2009): An outbreak of Q fever in Bulgaria. *Ann Ist Super Sanita* 45(1), 83-86.
- PAROLA P, PADDOCK CD, RAOULT D (2005): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18(4), 719-756.
- PAROLA P, ROVERY C, ROLAIN JM, BROUQUI P, DAVOUST B, RAOULT D (2009): *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in tick-borne rickettsioses. *Emerg Infect Dis* 15(7), 1105-1108.
- PERLMAN SJ, HUNTER MS, ZCHORI-FEIN E (2006): The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc Biol Sci* 273(1598), 2097-2106.
- PETTERSSON L, BOMAN J, JUITO P, EVANDER M, AHLN C (2008): Outbreak of Puumala virus infection, Sweden. *Emerg Infect Dis* 14(5), 808-810.
- PFEFFER M UND DOBLER G (2010): Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* 3(1), 35.
- PICHON B, KAHL O, HAMMER B, GRAY JS (2006): Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest. *Vector Borne Zoonotic Dis* 6(4), 382-387.
- PIECHOTOWSKI I, BROCKMANN SO, SCHWARZ C, WINTER CH, RANFT U, PFAFF G (2008): Emergence of hantavirus in South Germany: rodents, climate and human infections. *Parasitol Res* 103 Suppl 1, S131-S137.
- PORTEN K, RISSLAND J, TIGGES A, BROLL S, HOPP W, LUNEMANN M, TREECK U, KIMMIG P, BROCKMANN SO, WAGNER-WIENING C, HELLENBRAND W, BUCHHOLZ U (2006): A super-spreading ewe infects hundreds with Q fever at a farmers' market in Germany. *BMC Infect Dis* 8(147).
- PSAROULAKI A, HADJICHRISTODOULOU C, LOUKAIDES F, SOTERIADES E, KONSTANTINIDIS A, PAPASTERGIOU P, IOANNIDOU MC, TSELENTIS Y (2006a): Epidemiological study of Q-fever in humans, ruminant animals and ticks in Cyprus using a geographical information system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25(9), 576-586.
- PSAROULAKI A, RAGIADAKOU D, KOURIS G, PAPADOPOULOS B, TSELENTIS Y (2006b): Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the greek island of Cephalonia. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 389-399.
- PUNDA-POLIC V, PETROVEC M, TRILAR T, DUH D, BRADARIC N, KLISMANIC Z, AVISC-ZUPANC T (2002): Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp Appl Acarol* 28(1-4), 169-176.
- RANDOLPH SE, GERN L, NUTTALL PA (1996): Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology today* 12(12), 472-479.

- RANDOLPH SE UND ROGERS J (2000):** Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. *Proc Biol Sci* 267(1454), 1741-1744.
- RANDOLPH SE (2004):** Evidence that climate change has caused "emergence" of tick-borne diseases in Europe? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 5-15.
- RANDOLPH SE (2010a):** Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe. *Euro Surveill* 15(27), 24-31.
- RANDOLPH SE (2010b):** To what extent has climate change contributed to the recent epidemiology of tick-borne diseases? *Vet Parasitol* 167, 92-94.
- RANDOLPH SE UND ROGERS DJ (2010):** The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nat Rev Microbiol* 8(5), 361-371.
- RAOULT D UND ROUX V (1997):** Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 10(4), 694-719.
- RAOULT D, BERBIS PH, ROUX V, XU W, MAURIN M (1997):** A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. *Lancet* 350(9071), 112-113.
- RAOULT D, LAKOS A, FENOLLAR F, BEYTOUT J, BROUQUI P, FOURNIER PE (2002):** Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. *Clin Infect Dis* 34(10), 1331-1336.
- RAOULT D, MARRIE TJ, MEGE JL (2005):** Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 5(4), 219-226.
- RAZZAUTI M, PLYUSNINA A, SIRONEN T, HENTTONEN H, PLYUSNIN A (2009):** Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. *J Gen Virol* 90, 1923-1931.
- REGNERY RL, SPRUILL CL, PLIKAYTIS BD (1991):** Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 173(5), 1576-1589.
- REHACEK J, LIEBISCH A, URVÖLGYI J, KOVACOVA E (1977):** Rickettsiae of the spotted fever group isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in South Germany. *Zentralbl Bakteriol Orig A* 239(2), 275-281.
- REHACEK J, URVÖLGYI J, KOCIANOVA E, JEDLICKA L (1992):** Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. *Folia Parasitol* 39(3), 265-284.
- RIZZOLI A, HAUFFE HC, TAGLIAPIETRA V, NETELER M, ROSA R (2009):** Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. *PLoS one* 4(2), e4336.
- RKI (1997a):** Q-Fieber-Ausbruch durch eine infizierte Damwildherde. *Epidemiologisches Bulletin* 36, 249-250.

- RKI (1997b):** Q-Fieber-Ausbruch, ausgehend von einer Lehr- und Forschungsstation für Tierzucht in Hessen. *Epidemiologisches Bulletin* 49, 347-349.
- RKI (1998):** Q-Fieber-Ausbruch in Freiburg. *Epidemiologisches Bulletin* 32, 230.
- RKI (1999):** Q-Fieber: Situation in Deutschland und Übersicht. *Epidemiologisches Bulletin* 33, 245-247.
- RKI (2001):** Ein Q-Fieber-Ausbruch im Hochsauerland und Nordhessen. *Epidemiologisches Bulletin* 26, 187-189.
- RKI (2008):** Q-Fieber: Vermehrtes Auftreten im Frühjahr 2008. *Epidemiologisches Bulletin* 25, 199-203.
- RKI (2009):** FSME: Risikogebiete in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* 18, 165-172.
- ROVERY C, BROUQUI P, RAOULT D (2008):** Questions on mediterranean spotted fever a century after its discovery. *Emerg Infect Dis* 14(9), 1360-1367.
- ROECKNER E UND JACOB D (2008):** Der Klimawandel ist voll im Gange: ein Überblick. In: Lozan JL et al. (Hrsg.): *Warnsignal Klima - Gesundheitsrisiken. Wissenschaftliche Auswertungen*, S. 19-34. ISBN 978-39809668-4-9.
- RYDKINA E, ROUX V, FETISOVA N, RUDAKOV N, GAFANOVA M, TARASEVICH I, RAOULT D (1999):** New rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union. *Emerg Infect Dis* 5(6), 811-814.
- SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12), 5463-5467.
- SANOGO YO, DAVOUST B, PAROLA P, CAMICAS JL, BROUQUI P, RAOULT D (2003):** Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. *Ann N Y Acad Sci* 990, 191-195.
- SATTA G, CHISU V, CABRAS P, FOIS F, MASALA G (2011):** Pathogens and symbionts in ticks: a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted microorganisms in Sardinia, Italy. *J Med Microbiol* 60(Pt 1), 63-68.
- SAUVAGE F, PENALBA C, VUILLAUME P, BOUE F, COUDRIER D, PONTIER D, ARTOIS M (2002):** Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerg Infect Dis* 8(12), 1509-1511.
- SCHAAF I (2005):** Untersuchungen zur Epidemiologie des Tettnang-Virus (Maus-Hepatitis-Virus) in Baden-Württemberg. *Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*.
- SCHEX S, DOBLER G, RIEHM J, MÜLLER J, ESSBAUER S (2010):** *Rickettsia* spp. in wild small mammals in lower Bavaria, south-eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis*, epub ahead of print.

- SCHIMMER B, TER SCHEGGET R, WEGDAM M, ZÜCHNER L, DE BRUIN A, SCHNEEBERGER PM, VEENSTRA T, VELLEMA P, VAN DER HOEK W (2010): The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infect Dis* 10(69).
- SCHLEGEL M, KLEMPA B, AUSTE B, BEMMANN M, SCHMIDT-CHANASIT J, BÜCHNER T, GROSCHUP MH, MEIKER M, BALKEMA-BUSCHMANN A, ZOLLER H, KRÜGER DH, ULRICH R (2009): Dobrava-Belgrade virus spillover infections, Germany. *Emerg Infect Dis* 15(12), 2017-2020.
- SCHMALJOHN C UND HJELLE B (1997): Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 3(2), 95-104.
- SCHMIDT-CHANASIT J, ESSBAUER S, PETRAITYTE R, YOSHIMATSU K, TACKMANN K, CONRATHS FJ, SASNAUSKAS K, ARIKAWA J, THOMAS A, PFEFFER M, SCHARNINGHAUSEN JJ, SPLETTSTOESSER W, WENK M, HECKEL G, ULRICH RG (2010): Extensive host sharing of central european Tula virus. *J Virol* 84(1), 459-474.
- SCHWAIGER M UND CASSINOTTI P (2003): Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of TBEV-RNA. *J Clin Virol* 27(2), 136-145.
- SEKEYOVA Z, ROUX V, XU W, REHACEK J, RAOULT D (1998): *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol* 48(Pt 4), 1455-1462.
- SELMI M, BERTOLOTTI L, TOMASSONE L, MANNELLI A (2008): *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and tick-borne lymphadenopathy, Tuscany, Italy. *Emerg Infect Dis* 14(5), 817-820.
- SESHADRI R, PAULSEN IT, EISEN JA, READ TD, NELSON KE, NELSON WC, WARD NL, TETTELIN H, DAVIDSEN TM, BEANAN MJ, DEBOY RT, DAUGHERTY SC, BRINKAC LM, MADUPU R, DODSON RJ, KHOURI HM, LEE KH, CARTY HA, SCANLAN D, HEINZEN RA, THOMPSON HA, SAMUEL JE, FRASER CM, HEIDELBERG JF (2003): Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(9), 5455-5460.
- SIRONEN T, PLYUSNINA A, ANDERSON HK, LODAL J, LEIRS H, NIEMIMAA J, HENTTONEN H, VAHERI A, LUNDKVIST A, PLYUSNIN A (2002): Distribution of Puumala hantavirus in Denmark: analysis of bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from Fyn and Jutland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2(1), 37-45.
- SMETANOVA K, SCHWARZOVA K, KOCIANOVA E (2006): Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 312-315.
- SPITALSKA E UND KOCIANOVA E (2003): Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. *Eur J Epidemiol* 18(3), 263-266.

- STARNINI G, CACCAMO F, FARCHI F, BABUDIERI S, BRUNETTI B, REZZA G (2005):** An outbreak of Q fever in a prison in Italy. *Epidemiol Infect* 133, 377-380.
- STIASNY K UND HEINZ FX (2006):** Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol* 87(Pt 10), 2755-2766.
- STING R, BREITLING N, OEHME R, KIMMIG P (2004):** Untersuchungen zum Vorkommen von *Coxiella burnetii* bei Schafen und Zecken der Gattung *Dermacentor* in Baden-Württemberg. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 111(10), 390-394.
- SÜSS J, SCHRADER C, ABEL U, BORMANE A, DUKS A, KALNINA V (2002):** Characterization of tick-borne encephalitis (TBE) foci in Germany and Latvia (1997-2000). *Int J Med Microbiol* 291 Suppl 33, 34-42.
- SÜSS J, SCHRADER C, FALK U, WOHANKA N (2004):** Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany - epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 69-79.
- SÜSS J (2008):** Tick-borne encephalitis in Europe and beyond - the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13(26), pii=18916.
- SÜSS J, DOBLER G, ZÖLLER G, ESSBAUER S, PFEFFER M, KLAUS C, LIEBLER-TENORIO EM, GELPI E, STARK B, HOTZEL H (2008):** Genetic characterisation of a tick-borne encephalitis virus isolated from the brain of a naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*). *Int J Med Microbiol* 298 S1, 295-300.
- SUMILO D, ASOKLIENE L, BORMANE A, VASILENKO V, GOLOVLJOVA I, RANDOLPH SE (2007):** Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS one* 6, e500.
- TABACHNICK WJ (2010):** Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne diseases epistystems in a changing world. *J Exp Biol* 213(6), 946-954.
- TAMURA A, OHASHI N, URAKAMI H, MIYAMURA S (1995):** Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45(3), 589-591.
- TERSAGO K, VERHAGEN R, SERVAIS A, HEYMAN P, DUCOFFRE G, LEIRS H (2009):** Hantavirus disease (nephropathia epidemica) in Belgium: effects of tree seed production and climate. *Epidemiol Infect* 137(2), 250-256.
- TOLEDO A, JADO I, OLMEDA AS, CASADO-NISTAL MA, GIL H, ESCUDERO R, ANDA P (2009):** Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9(5), 465-468.
- TURNI H (2005a):** Gelbhalsmaus *Apodemus flavicollis*. In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 229-237. ISBN: 3-8001-4246-5.

- TURNI H (2005b):** Waldmaus *Apodemus sylvaticus*. In: Braun M und Dieterlen F (Hrsg.): *Die Säugetiere Baden-Württembergs, Band 2*. Ulmer Verlag, S. 238-243. ISBN: 3-8001-4246-5.
- ULRICH RG, SCHMIDT-CHANASIT J, SCHLEGEL M, JACOB J, PELZ HJ, MERTENS M, WENK M, BÜCHNER T, MASUR D, SEVKE K, GROSCHUP MH, GERSTENGARBE FW, PFEFFER M, OEHME R, WEGENER W, BEMMANN M, PHLMAYER L, WOLF R, ZOLLER H, KOCH J, BROCKMANN S, HECKEL G, ESSBAUER SS (2008):** Network "rodent-borne pathogens" in Germany: longitudinal studies on the geographical distribution and prevalence of hantavirus infections. *Parasitol Res* 103 Suppl 1, S121-S129.
- VAHERI A, VAPALAHTI O, PLYUSNIN A (2008):** How to diagnose hantavirus infections and detect them in rodents and insectivores. *Rev Med Virol* 18(4), 277-288.
- VANWAMBEKE SO, SUMILO D, BORMANE A, LAMBIN EF, RANDOLPH SE (2010):** Landscape predictors of tick-borne encephalitis in Latvia: land cover, land use, and land ownership. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(5), 497-506.
- VAPALAHTI O, MUSTRONEN J, LUNDKVIST A, HENTTONEN H, PLYUSNIN A, VAHERI A (2003):** Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3(10), 653-661.
- VITORINO L, DE SOUSA R, BACELLAR F, ZE-ZE L (2007):** *Rickettsia* sp. strain RpA4 detected in Portuguese *Dermacentor marginatus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2), 217-220.
- VON HAESELER A UND LIEBERS D (2003):** Molekulare Evolution. *Fischer Taschenbuch Verlag, Originalausgabe*. ISBN 3-596-15365-4.
- WALKER DH, VALBUENA GA, OLANO JP (2003):** Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Ann N Y Acad Sci* 990, 1-11.
- WALLENSTEIN A, MOORE P, WEBSTER H, JOHNSON C, VAN DER BURGT G, PRITCHARD G, ELLIS-IVERSEN J, OLIVER I (2010):** Q fever outbreak in Cheltenham, United Kingdom, in 2007 and the use of dispersion modelling to investigate the possibility of airborne spread. *Euro Surveill* 15(12), pii=19526.
- WEBSTER JP, LLOYD G, MACDONALD DW (1995):** Q-fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. *Parasitology* 110(Pt1), 31-35.
- WEINERT LA, WERREN JH, AEBI A, STONE GN, JIGGINS FM (2009):** Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol* 7, 6.
- WESSEL M (2010):** Vergleichende epidemiologische Untersuchungen zur FSME. *Diplomarbeit aus dem Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim*.
- WESTHEIDE W UND RIEGER R (2004):** Spezielle Zoologie. Teil 2: Wirbel- oder Schädeltiere. *Spektrum Akademischer Verlag, 1. Auflage*. ISBN 3-8274-0307-3.

-
- WÖLFEL R, TERZIOGLU R, KIESSLING J, WILHELM S, ESSBAUER S, PFEFFER M, DOBLER G (2006):** *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Ann N Y Acad Sci* 1078, 509-511.
- WÖLFEL R, ESSBAUER S, DOBLER G (2008):** Diagnostics of tick-borne rickettsioses in Germany: a modern concept for a neglected disease. *Int J Med Microbiol* 298 S1, 368-374.
- ZAHLER M, GOTHE R, RINDER H (1996):** *Dermacentor*-Zecken in Frankreich und Deutschland: zur molekularbiologischen Artdifferenzierung, Ökologie und epidemiologischen Bedeutung. *Tierärztl Praxis* 24(3), 209-211.
- ZEMAN P UND BENES C (2004):** A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? *Int J Med Microbiol* 293 Suppl 37, 48-54.
- ZHAN L, CAO W, CHU C, JIANG B, ZHANG F, LIU W, DUMLER JS, WU X, ZUO S, ZHANG P, HUANG H, ZHAO Q, JIA N, YANG H, RICHARDUS JH, HABBEMA JDF (2009):** Tick-borne agents in rodents, China, 2004-2006. *Emerg Infect Dis* 15(12), 1904-1908.
- ZHANG Y, CORVER J, CHIPMAN PR, ZHANG W, PLETNEV SV, SEDLAK D, BAKER TS, STRAUSS JH, KUHN RJ, ROSSMANN MG (2003):** Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J* 22(11), 2604-2613.

8. Anhang

Tab. 34: Zur Stammbaumberechnung verwendete FSME-Virus-Stämme aus der Gen-Datenbank sowie die zugehörigen accession numbers für E- und NS2a-Gen-Sequenzen. Im Stammbaum verwendete Bezeichnungen, die vom jeweiligen Stammnamen abweichen, sind in Klammern angegeben.

FSME-Virus-Stamm	accession number		FSME-Virus-Subtyp
	E-Gen	NS2a-Gen	
178-79	EF469661	EF469661	fernöstlich
205	DQ989336	DQ989336	fernöstlich
886-84	EF469662	EF469662	fernöstlich
Dalnégorsk	FJ402886	FJ402886	fernöstlich
Glubinnoe	DQ862460	DQ862460	fernöstlich
Kavalerovo	FJ402885	FJ402885	fernöstlich
MDJ-01	AY217093	AY217093	fernöstlich
Oshima	AB001026	AB062063	fernöstlich
Primorye	AY169390	EU816450	fernöstlich
Senzhang	AY174188	AY182009	fernöstlich
Sofjin	X07755	AB062064	fernöstlich
Svetlogorie (Svetlogori)	GU121642	GU121642	fernöstlich
EK-328	DQ486861	DQ486861	sibirisch
Kolarovo	FJ968751	FJ968751	sibirisch
Vasilchenko (Vasilchenk)	M97659	AF069066	sibirisch
Zausaev	AF527415	AF527415	sibirisch
263	U27491	U27491	europäisch
AS33	GQ266392	GQ266392	europäisch
Hypr	U39292	U39292	europäisch
K23	AF091010	AM600965	europäisch
Kumlíngé	AY268437	---	europäisch
Neudoerfl	U27495	U27495	europäisch
Salem	FJ572210	FJ572210	europäisch
Toro	DQ401140	DQ401140	europäisch
Louping ill-Virus (LoupingIII)	Y07863	Y07863	<i>Flavivirus</i>
Omsk Hämorrhagisches Fieber-Virus (OHF)	X66694	AY438626	<i>Flavivirus</i> (Außengruppe)

Danksagung

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

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

Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig, Fachgebiet Parasitologie der Universität Hohenheim, gilt mein herzlicher Dank für die fachliche Betreuung und Korrektur der Arbeit trotz Ruhestand sowie für viele sprachliche Diskussionen und etymologische Erkenntnisse.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Steidle, Fachgebiet Tierökologie der Universität Hohenheim, möchte ich mich für die kurzfristige Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Günther Schmolz, Abteilungsleiter des Landesgesundheitsamts Baden-Württemberg im Regierungspräsidium Stuttgart, danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Dr. Kathrin Hartelt, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, für die Einführung in die molekularbiologischen Methoden, für ihre geduldige Hilfe und konstruktiven Vorschläge bei allen Fragen und für viele freundschaftliche Ratschläge.

Ebenfalls Dank an Herrn Dr. Rainer Oehme, Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg, für seine fortwährende Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Allen MitarbeiterInnen des Landesgesundheitsamts, insbesondere Frau Dr. Astrid Kirch, Frau Christine Herrmann, Frau Elke Gutwein, Frau Isolde Zeller, Frau Margit Ergenzinger und Frau Rita Beresowski, danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre sowie jede Menge praktische Labor- und Alltagstipps.

Herrn Dr. Michael Merli danke ich herzlich für die Einführung in die Geheimnisse der Mäusejagd und -sektion. Außerdem danke ich allen, die mich beim Nager fangen und beim Zecken sammeln tatkräftig unterstützt haben, insbesondere Thomas, Maren, Philipp, Isolde, Aleks, Franziska, Kathrin und Rainer.

Für die Bereitstellung von Zecken danke ich Herrn Dr. Trevor Petney und Frau Dipl. Biol. Jasmin Skuballa (KIT Karlsruhe) sowie Frau Dr. Gabriele Liebisch (ZeckLab, Burgwedel).

Herrn Dr. Gerhard Dobler, Frau Dr. Sandra Essbauer und Frau Susanne Schex vom Mikrobiologischen Institut der Bundeswehr gilt mein Dank für die Einführung in die Rickettsien-Serologie, die Bereitstellung von Positivmaterial für die Rickettsien-PCR und -Serologie sowie für die wertvolle Hilfe bei der Erstellung der FSME-Virus-Stammbäume.

Herrn Dr. Rainer Ulrich und Frau Dörte Kaufmann vom Friedrich-Löffler-Institut in Riems danke ich für die serologische Untersuchung der Nager auf Hantavirus-Antikörper.

Frau Dipl. biol. Maren Wessel danke ich für ihre Ausdauer beim Korrekturlesen der Arbeit und ihre konstruktive Kritik sowie ihre andauernde moralische Unterstützung und Freundschaft. Vielen Dank!

Meinen Freunden Meike, Sibylle, Daniela, Jenny und Thomas danke ich für ihre Unterstützung und aufmunternden Worte sowie für viele entspannte Stunden.

Für so manche schöne Ablenkung danke ich meiner Familie, besonders Alex, Nicole und Louis. Mein besonderer Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich immer tatkräftig unterstützt und bestärkt haben.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Grimminger-Stiftung für Anthropozoonosenforschung sowie dem Landesamt für Umwelt, Messungen und Naturschutz Baden-Württemberg (LUBW) finanziert.

Lebenslauf

Name, Vorname	Pluta, Silvia
Geburtstag	27.8.1981
Geburtsort	Filderstadt
Berufsbezeichnung	Diplom-Biologin
Familienstand	ledig

Schulbildung

08/1988 – 07/1992	Flattich-Grundschule, 70825 Korntal-Münchingen
08/1992 – 07/2001	Gymnasium Korntal, 70825 Korntal-Münchingen
	Abschluss: Abitur

Studium

10/2001 – 09/2006	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim Abschlussnote: 1,3 Schwerpunkte: Zoologie (Hauptfach), Parasitologie (Nebenfach), Medizinische Mikrobiologie (Nebenfach) Thema der Diplomarbeit: „Molekularbiologische Typisierung von Endobakterien der Gattung <i>Wolbachia</i> in <i>Simulium</i> -Arten“
seit Oktober 2006	Dissertation an der Universität Hohenheim, Abteilung Parasitologie, in Kooperation mit dem Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg (Referat 93) im Regierungspräsidium Stuttgart. Thema der Arbeit: „Epidemiologie von <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Rickettsia</i> spp., FSME- und Hantaviren in Süddeutschland unter Berücksichtigung klimatischer Veränderungen“

Praktikum während des Studiums

08/2004 – 10/2004	Gemeinschaftspraxis Dr. med. Schulz, Ludwigsburg; Abteilung Mikrobiologie
-------------------	--

ehrenamtliche Tätigkeit

seit März 2010 ehrenamtliche Tätigkeit im Zoologisch-Botanischen Garten
Wilhelma in Stuttgart („Wilhelmabegleiter“)

Publikationen

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P, 2010:

Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in Southern Germany. Ticks Tick-borne Dis, 1(3), 145-147.

Kimmig P, Pluta S, Naucke T, 2010: Globale Erwärmung: Infektionsgefahr aus dem Süden. Biologie in unserer Zeit 40(1), 21-28.

Pluta S, Tewald F, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2009:

Rickettsia slovaca in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany.

Emerg Infect Dis, 15(12), 2077-2078.

Hartelt K, Pluta S, Oehme R, Kimmig P, 2008:

Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming.

Parasitol Res, 103 Suppl 1, 109-116

Tagungsbeiträge

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2010:

The role of *Dermacentor* ticks in the epidemiology of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in Southern Germany.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Düsseldorf, 17.-20. März 2010.

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2009:

Dermacentor ticks as vectors for *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in Southern Germany. Tagung der Deutschen Gesellschaft für medizinische Entomologie und Acarologie, Frankfurt, 29.-31. Oktober 2009.

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2009:

Prevalence of *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in ticks and rodents in Southern Germany. International Jena Symposium on tick-borne diseases, Weimar, 19.-21. März 2009.

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2009:

Verbreitung von *Rickettsia* spp. und *Coxiella burnetii* in Zecken und Nagern in Baden-Württemberg.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie, Göttingen, 16.-19. März 2009

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Kimmig P, Mackenstedt U, 2008:

„Climate change and vector-borne diseases“: First results concerning *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp. and Hantaviruses.

Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Hamburg, 5.-7. März 2008

Pluta S, 2007:

Projekt „Klimawandel: Gefährdung durch vektorübertragene Infektionen“: erste Ergebnisse in Bezug auf *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp. und Hantaviren.

Tagung der Deutschen Gesellschaft für medizinische Entomologie und Acarologie, Bochum, 11.-12. Oktober 2007