

# **Die Rolle des Europäischen Igels (*Erinaceus europaeus*) in der Epidemiologie zeckenübertragener Krankheiten**

**-*Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. und FSME-Viren-**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)-Universitätsbereich

genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Jasmin Desirée Skuballa**

aus

**Karlsruhe**

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Horst Taraschewski

1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig

2. Korreferent: Prof. Dr. Doris Wedlich

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2011



Meiner Familie



Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Skuballa J, Petney TN, Pfäffle M, Oehme R, Hartelt K, Fingerle V, Kimmig P, Taraschewski H (2011) Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis* and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. Ticks and Tick-borne Diseases (in press).

Skuballa J, Pfäffle M, Petney TN, Taraschewski H (2010) Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its ticks. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 10: 1055-1057.

Skuballa J, Oehme R, Hartelt K, Petney T, Bücher T, Kimmig P, Taraschewski H (2007) European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. Emerging Infectious Diseases 13: 952-953.

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem Landesgesundheitsamt Baden-Württemberg durchgeführt und gefördert durch:

ein Stipendium der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg

und ein Stipendium der Grimminger-Stiftung für Zoonosenforschung, Stuttgart.

## Zusammenfassung

Vektorübertragene Erreger zirkulieren in der Natur innerhalb vielfältiger Transmissionszyklen zwischen blutsaugenden Arthropoden und Wirbeltieren und können letztendlich auch den Menschen erreichen. Grundlegende Untersuchungen zur Erreger-Vektor-Wirts-Beziehung sind daher notwendig, um die komplexen epidemiologischen Zusammenhänge zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stellung von Igel, insbesondere der Art *Erinaceus europaeus*, im Kreislauf von zeckenassoziierten Erregern in West- und Mitteleuropa untersucht. Der Schwerpunkt der Studie lag dabei auf Borrelien des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes, aber auch zur Epidemiologie von Anaplasmen, Rickettsien und des FSME-Virus konnten neue Daten gewonnen werden. Für die molekularbiologische Untersuchung auf die genannten Erreger wurden Organproben von Sektionsigeln und von Igel abgesammelte Zecken (*Ixodes hexagonus* und *Ixodes ricinus*) verwendet. Des Weiteren wurden Blutproben von lebenden Igel mithilfe eines modifizierten ELISAs und Immunblots auf spezifische Antikörper gegen Borrelien getestet. Ergänzt wurde die *B. burgdorferi* s.l. Untersuchung durch Xenodiagnose an experimentell und natürlich infizierten Igel.

Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren deutlich, dass Igel eine nicht zu unterschätzende Rolle im Kreislauf von zeckenübertragenen Erregern mit humanpathogenem Potential einnehmen. Anhand der gewonnenen Daten zeigt sich das Reservoirpotential des Igel für Borrelien (*Borrelia afzelii*, *Borrelia bavariensis* und *Borrelia spielmanii*), was auch durch Xenodiagnose bestätigt werden konnte. Insbesondere juvenile Igel und Igelindividuen mit einem schlechten Allgemeinbefinden scheinen empfänglich für eine Infektion zu sein. Demgegenüber stehen der hohe IgG-Titer gegen spezifische *Borrelia*-Antigene und die niedrige Transmissionsrate von Borrelien auf Zecken bei adulten Tieren, was auf eine Verringerung der Reservoirkompetenz durch eine erworbene Immunität hindeutet.

Auch im Kreislauf von *Anaplasma phagocytophilum* nehmen Igel eine wichtige Position ein. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Igel für eine „igelspezifische“ *A. phagocytophilum*-Variante, aber auch für weitere Genotypen empfänglich sind.

An der Verbreitung von Rickettsien sind Igel ebenfalls deutlich beteiligt. Rickettsien wurden sowohl in einer Hautprobe als auch in allen 3 Entwicklungsstadien von in *I. ricinus* und *I. hexagonus* nachgewiesen. Die Sequenzierung bestätigte die Infektion beider Zeckenarten mit *Rickettsia helvetica*. Die 3 genannten Erreger wurden nicht nur in *I. ricinus*, sondern auch

in *I. hexagonus* gefunden, was auch für die Involvierung von wirtsspezifischen Zecken in der Epidemiologie dieser Erreger spricht.

Der molekularbiologische Nachweis von FSME-Viren im Nierengewebe eines Tieres beweist, dass Igel auch für virale Erreger anfällig sind.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde nur ein kleines Repertoire an zeckenassoziierten Erregern untersucht. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass Igel durch einen häufigen und starken Ektoparasitenbefall auch an der Verbreitung weiterer vektorübertragener Erreger (z.B. *Babesia* spp., *Bartonella* spp. und *Francisella* spp.) beteiligt sind. Die gewonnenen Daten sollten daher als Grundlage und Ausgangsbasis für weitere Untersuchungen dienen, um einerseits Schutzstrategien für den Igel zu entwickeln, aber auch andererseits auf die zoonotische Bedeutung aufmerksam zu machen.

## Summary

**Title: The role of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in the epidemiology of tick-borne diseases (*Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. and TBE-virus).**

Vector-borne pathogens circulate in nature between blood-sucking arthropods and vertebrate hosts via a variety of transmission cycles through which they can also reach humans. Basic investigations on the pathogen-vector-host relationship are therefore necessary in order to understand such a complex epidemiological situation.

The work presented focuses on the role of hedgehogs, notably *Erinaceus europaeus*, in the circulation of tick-borne pathogens in Western and Central Europe. New data are presented particularly with regard to various genospecies of the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex, but also involving the epidemiology of *Anaplasma* species, *Rickettsia* species and tick-borne encephalitis (TBE) virus. For the molecular investigation of these pathogens, organs of dissected animals, as well as ticks (*Ixodes hexagonus* and *Ixodes ricinus*) removed from hedgehogs, were used. In addition blood samples from living animals were tested by a modified ELISA and an immunoblot for specific antibodies against *Borrelia* genospecies. The *B. burgdorferi* s.l. investigation was supplemented by xenodiagnosis on experimentally and naturally infected hedgehogs.

The results obtained demonstrate that hedgehogs play a significant role in the circulation of tick-borne pathogens with pathogenic potential for humans. The data acquired prove the reservoir potential of hedgehogs for certain *Borrelia* genospecies (*Borrelia afzelii*, *Borrelia bavariensis* and *Borrelia spielmanii*). In particular juvenile hedgehogs or individuals with a reduced health status seem to be susceptible to infection. In contrast to this, high IgG-titers against specific *Borrelia* antigens and the low transmission rate from adult animals to ticks indicate a reduction in the reservoir competence of hedgehogs presumably caused by adaptive immunity.

Hedgehogs are also involved in the circulation of *Anaplasma phagocytophilum*. My results show that they are susceptible to a specific “hedgehog variant”, but also to other genotypes.

In a similar way, hedgehogs play a role in the epidemiology of *Rickettsia* species. Rickettsial DNA could be detected in a skin sample of one animal, as well as in all life history stages of

*I. hexagonus* and *I. ricinus* ticks. Sequencing confirmed the presence of *Rickettsia helvetica* in both tick species. Finding the pathogens not only in *I. ricinus*, but also in *I. hexagonus*, indicates the involvement of both species in the circulation of these pathogens.

The molecular detection of TBE-virus in the kidney of one animal confirms the susceptibility of hedgehogs to viral infections.

In this study a limited repertoire of tick-borne pathogens was examined. However, it has to be assumed that hedgehogs with a high burden of different ectoparasites are also involved in the spreading of other vector-borne pathogens (e.g. *Babesia*, *Bartonella* and *Francisella*). Hence, the data obtained should serve as a baseline for further investigations, and should help in the development of conservation strategies for hedgehogs, as well as calling attention to the zoonotic potential.

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	i
Summary .....	iii
Inhaltsverzeichnis.....	v
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Fragestellung und Zielsetzung .....</b>	<b>4</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Zur Biologie und Ökologie von Igel (Erinaceidae) .....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.1 Systematik und Verbreitung.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2 Kleinohrigel (<i>Erinaceus</i> spp.).....</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3 Zur Biologie und Ökologie des Europäischen Igels.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1.4 Ektoparasiten und vektorassoziierte Erreger des Igels.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Zur Biologie und Ökologie von Zecken (Ixodidae) .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1 Systematik und Verbreitung.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Lebensweise und Ökologie .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3 Morphologie von <i>Ixodes</i> spp.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.4 <i>Ixodes ricinus</i> .....</b>	<b>16</b>
2.2.4.1 Verbreitung und Ökologie .....	16
<b>2.2.5 <i>Ixodes hexagonus</i> .....</b>	<b>19</b>
2.2.5.1 Verbreitung und Ökologie .....	19
<b>2.3 Zeckenübertragene Erreger .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.1 Allgemeines .....</b>	<b>21</b>
2.3.1.1 Übertragungsmechanismen zeckenübertragener Erreger.....	21
2.3.1.2 Reservoirwirte und nicht reservoirkompetente Wirte.....	22
<b>2.3.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. (Lyme-Borreliose).....</b>	<b>23</b>
2.3.2.1 Allgemeines .....	23
2.3.2.2 Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften .....	23
2.3.2.3 Verbreitung und Epidemiologie.....	28
2.3.2.4 <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. als Krankheitserreger .....	29
2.3.2.5 Diagnostik .....	32
<b>2.3.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Anaplasmose).....</b>	<b>34</b>
2.3.3.1 Allgemeines .....	34

---

2.3.3.2	Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften .....	34
2.3.3.3	Verbreitung und Epidemiologie.....	37
2.3.3.4	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> als Krankheitserreger.....	38
<b>2.3.4</b>	<b><i>Rickettsia</i> spp. (Rickettsiosen) .....</b>	<b>39</b>
2.3.4.1	Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften .....	39
2.3.4.2	Verbreitung und Epidemiologie.....	41
2.3.4.3	Rickettsien als Krankheitserreger .....	41
2.3.4.4	<i>Rickettsia helvetica</i> .....	42
<b>2.3.5</b>	<b>FSME-Viren (Frühsommer-Meningo-Enzephalitis) .....</b>	<b>43</b>
2.3.5.1	Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften .....	43
2.3.5.2	Verbreitung und Epidemiologie.....	44
2.3.5.3	FSME-Viren als Krankheitserreger .....	46
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>49</b>
3.1.1	Sektionsigel .....	49
3.1.2	Zecken von Igel..	49
3.1.3	Blutproben von Igel .....	49
<b>3.2</b>	<b>Allgemeine Methoden .....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Sektion.....	51
3.2.2	Bestimmung der Ektoparasiten .....	51
3.2.3	Blutabnahme und Serumgewinnung.....	51
3.2.4	Experimentelle Untersuchungen .....	53
3.2.4.1	Material .....	54
3.2.4.2	Methoden .....	54
<b>3.3</b>	<b>Immunbiologische Methoden .....</b>	<b>56</b>
3.3.1	ELISA.....	56
3.3.1.1	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ELISA .....	56
3.3.1.2	FSME-ELISA.....	58
3.3.2	Immunblot .....	58
3.3.2.1	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. Immunblot .....	58
<b>3.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>61</b>
3.4.1	Nukleinsäureextraktion .....	61
3.4.1.1	DNA-Extraktion mithilfe der Chelex 100 Matrix.....	61
3.4.1.2	DNA-Extraktion mithilfe des Maxwell 16 Instrumentes .....	62

3.4.1.3	DNA-Isolierung mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit .....	62
<b>3.4.2</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</b>	<b>63</b>
3.4.2.1	Real-time PCR .....	64
3.4.2.2	Real-time PCR mittels LightCycler .....	64
<b>3.4.3</b>	<b>Spezifischer Nachweis von <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ....</b>	<b>67</b>
3.4.3.1	5S23S rDNA-PCR .....	67
3.4.3.2	OspA-PCR mittels LightCycler .....	69
<b>3.4.4</b>	<b>Spezifischer Nachweis von <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....</b>	<b>71</b>
3.4.4.1	16S rDNA-PCR mittels LightCycler .....	71
3.4.4.2	16S rDNA-PCR.....	72
<b>3.4.5</b>	<b>Spezifischer Nachweis von <i>Rickettsia</i> spp. ....</b>	<b>74</b>
3.4.5.1	gltA-PCR mittels LightCycler.....	74
<b>3.4.6</b>	<b>Spezifischer Nachweis von FSME-Viren .....</b>	<b>76</b>
3.4.6.1	Reverse Transkription mithilfe der AMV-Transkriptase.....	76
3.4.6.2	FSME-PCR .....	77
<b>3.4.7</b>	<b>Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel .....</b>	<b>79</b>
3.4.7.1	Agarosegel für Nachweis der untersuchten Erreger.....	79
<b>3.4.8</b>	<b>Sequenzierung .....</b>	<b>80</b>
3.4.8.1	Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion .....	80
3.4.8.2	Sequenzierreaktion.....	81
3.4.8.3	Aufreinigung der Sequenzierprodukte .....	82
3.4.8.4	Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer .....	82
3.4.8.5	Auswertung der Sequenzdaten.....	83
<b>3.4.9</b>	<b>Klonierung .....</b>	<b>83</b>
3.4.9.1	Klonierung von PCR-Produkten .....	83
3.4.9.2	Transformation.....	85
<b>3.5</b>	<b>Verwendete Geräte und Reagenzien .....</b>	<b>87</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....</b>	<b>87</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Lösungen und Puffer .....</b>	<b>90</b>
3.5.2.1	Lösungen und Puffer für die Nukleinsäureextraktion.....	90
3.5.2.2	Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese .....	91
<b>3.6</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>92</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>93</b>
<b>4.1</b>	<b>Pathogene im Wirtstier Igel .....</b>	<b>93</b>

---

<b>4.1.1</b>	<b><i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i></b> .....	<b>93</b>
4.1.1.1	Molekularbiologischer Nachweis .....	93
4.1.1.2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. Artdifferenzierung .....	96
4.1.1.2.1	Verteilung der Genospezies .....	100
4.1.1.3	Serologischer Nachweis .....	103
4.1.1.3.1	Serologisches Screening (ELISA).....	103
4.1.1.3.2	Bestätigungstest (Immunblot) .....	104
<b>4.1.2</b>	<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i></b> .....	<b>113</b>
4.1.2.1	Molekularbiologischer Nachweis .....	113
4.1.2.2	Sequenzierung und Klonierung der PCR-Produkte .....	118
<b>4.1.3</b>	<b><i>Rickettsia spp.</i></b> .....	<b>120</b>
4.1.3.1	Molekularbiologischer Nachweis .....	120
<b>4.1.4</b>	<b>FSME-Viren</b> .....	<b>120</b>
4.1.4.1	Molekularbiologischer Nachweis .....	120
4.1.4.2	Serologischer Nachweis .....	120
<b>4.2</b>	<b>Experimentelle Untersuchung zur Übertragung von Borrelien</b> .....	<b>121</b>
4.2.1.1	Experimenteller Infektionsweg .....	121
4.2.1.2	Natürlicher Infektionsweg.....	123
<b>4.3</b>	<b>Pathogene in Zecken von Igel</b> .....	<b>126</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>Borrelia spp.</i></b> .....	<b>127</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>Anaplasma spp.</i></b> .....	<b>128</b>
<b>4.3.3</b>	<b><i>Rickettsia spp.</i></b> .....	<b>129</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Einzelne Tiere als “Superspreaders”</b> .....	<b>130</b>
<b>4.4</b>	<b>Koinfektionen von Pathogenen</b> .....	<b>131</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>133</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.</b> .....	<b>133</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme</b> .....	<b>133</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Epidemiologische Daten</b> .....	<b>134</b>
5.1.2.1	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. im Wirtstier Igel .....	134
5.1.2.2	Verteilung und Differenzierung der <i>Borrelia</i> -Genospezies.....	138
5.1.2.3	Serologischer Nachweis .....	145
5.1.2.3.1	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. ELISA.....	145
5.1.2.3.2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. Immunblot .....	146
5.1.2.4	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. in gesaugten Zecken .....	150

---

<b>5.1.3</b>	<b>Experimentelle Untersuchung zur Übertragung von Borrelien .....</b>	<b>152</b>
5.1.3.1	Experimentelle Infektion.....	152
5.1.3.2	Natürliche Infektion .....	153
<b>5.1.4</b>	<b>Mögliche Immunität bei Igeln?.....</b>	<b>157</b>
<b>5.2</b>	<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i>.....</b>	<b>160</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme.....</b>	<b>160</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Epidemiologische Daten .....</b>	<b>160</b>
5.2.2.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> im Wirtstier Igel .....	160
5.2.2.2	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> in gesaugten Zecken .....	167
<b>5.3</b>	<b><i>Rickettsia</i> spp.....</b>	<b>168</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme.....</b>	<b>168</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Epidemiologische Daten .....</b>	<b>169</b>
5.3.2.1	<i>Rickettsia</i> spp. im Wirtstier Igel.....	169
5.3.2.2	<i>Rickettsia</i> spp. in gesaugten Zecken .....	170
<b>5.4</b>	<b>FSME-Viren.....</b>	<b>172</b>
<b>5.4.1</b>	<b>Sensitivität und Spezifität des PCR-Nachweissystems .....</b>	<b>172</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Epidemiologische Daten .....</b>	<b>172</b>
5.4.2.1	FSME-Viren im Wirtstier Igel .....	172
5.4.2.2	Serologischer Nachweis .....	175
<b>5.5</b>	<b>Mischinfektionen von Erregern in Zecken und Wirtstieren.....</b>	<b>176</b>
<b>6</b>	<b>Fazit und Ausblick .....</b>	<b>178</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>180</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>216</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>238</b>
	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>240</b>

# 1 Einleitung

Blutsaugende Arthropoden wie Stechmücken, Zecken, Flöhe, Läuse und Milben übertragen weltweit gefährliche Krankheitserreger (Gubler 1998, 2009). Da die Übertragung über den Stich eines Gliederfüßers erfolgt, spricht man von vektorübertragenen Krankheiten. Innerhalb der Zoonosen, Erkrankungen, die vom Tier auf den Menschen übergehen können, zählen die von Vektoren übertragenen Erkrankungen mittlerweile zu den häufigsten „emerging infectious diseases (EIDs)“. Der Begriff EIDs bezeichnet Infektionskrankheiten, die in den letzten Jahrzehnten im Vorkommen gestiegen oder erstmalig aufgetaucht sind (Haas et al. 2004, Morens et al. 2004, Jones et al. 2008, Gubler 2009).

Die durch Zecken übertragenen Krankheitserreger gewinnen als sogenannte „emerging tick-borne infections“ aufgrund des gesteigerten öffentlichen Interesses an Zecken als Vektoren und aus ökonomischen Gründen sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin immer mehr an Bedeutung (Childs et al. 1998, Morens et al. 2004, Gubler 2009). Bei vektorübertragenen Krankheiten ist eine Berücksichtigung und Erforschung der ökologischen Zusammenhänge zwischen Erregern, Vektoren und Wirten essentiell, um die komplexe Epidemiologie zu verstehen (Gern & Humair 2002). Die geografische Verbreitung von Zecken und der damit verbundenen Krankheitserreger hängt von Umweltfaktoren wie klimatischen Bedingungen, Biotoptypen sowie der Abundanz der Zecken und ihrer Wirtstiere ab (Jaenson et al. 2009, Reisen 2010). Jedoch beeinflussen auch Eingriffe des Menschen in die Umwelt zusammen mit dem Klimawandel die Verbreitung von Zecken und zeckenassoziierten Erregern (Gilbert 2010).

Der Gemeine Holzbock, *Ixodes ricinus*, überträgt eine Reihe von Pathogenen, die in der Human- und Veterinärmedizin von großer Bedeutung sind. Dazu gehören verschiedene Viren (z.B. das FSME-Virus), Bakterien (z.B. Borrelien, Anaplasmen, Rickettsien) und Protozoen (z.B. Babesien). Insbesondere für Menschen (z.B. Forstarbeiter) und Tiere, die häufig in Kontakt mit Zecken kommen, besteht ein erhöhtes Infektions- und Erkrankungsrisiko (Zhioua et al. 1997, Oehme et al. 2002).

Um endemische Kreisläufe von Pathogenen aufrecht zu erhalten, müssen in einem Habitat geeignete Reservoirwirte vorhanden sein, die in der Lage sind, den Erreger aufzunehmen und an saugende Zeckenindividuen weiterzugeben. Bei mehrwirtigen Zeckenarten wie *I. ricinus* tragen gleich mehrere Wirtstierarten zur Aufrechterhaltung von Erreger-Zyklen bei, abhängig

von ihrer Transmissionskompetenz und der Stärke des Befalls mit den einzelnen Entwicklungsstadien der Zecken (Kurtenbach et al. 1995, 1998 a).

Die häufigste von Vektoren übertragene Krankheit in Europa und Nordamerika ist die Lyme-Borreliose, bei der man in Deutschland, basierend auf regional durchgeführten epidemiologischen Studien, jährlich von 50.000-80.000 Neuerkrankungen ausgehen kann (Hubálek 2009). Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, die sich in vielfältigen klinischen Erscheinungsformen bemerkbar machen kann. So komplex wie die Krankheit selbst, ist auch der Lebenszyklus ihres Erregers *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Die Klärung der Wirt-Vektor-Interaktion(en) verkompliziert sich durch die Unterteilung von *B. burgdorferi* s.l. in mehrere Genospezies, die in unterschiedliche epidemiologische Kreisläufe eingebunden und jeweils mit verschiedenen Reservoirtieren assoziiert sind (Hanincová et al. 2003, Kurtenbach et al. 2006, Gern 2008).

Nicht nur Borrelien, sondern auch andere Bakterien wie *Anaplasma phagocytophilum* zirkulieren in Zecken-Wirtstier-Zyklen. Dieses Bakterium verursacht die granulozytäre Anaplasmose bei Mensch und Tier und wird ebenfalls zu den „emerging infectious diseases“ gezählt. Obwohl die Krankheit im Vergleich zur Lyme-Borreliose wenig bekannt ist, wird anhand von Prävalenzstudien in Zecken und Wirtstieren vermutet, dass *A. phagocytophilum* in Europa zu den häufigsten von Zecken übertragenen Erregern zählt (Stuen 2007).

Weitere Pathogene, die von Zecken und anderen blutsaugenden Vektoren übertragen werden können, sind Rickettsien. Dabei unterscheidet man mehrere Arten, die bei Mensch und Tier unterschiedliche Formen des Fleckfiebers auslösen können (Bogdan 2009, Dobler & Wölfel 2009).

Der derzeitige Kenntnisstand über das Vorkommen der von Zecken übertragenen Erreger in Deutschland ist sehr lückenhaft und basiert hauptsächlich auf ermittelten Befallshäufigkeiten von *I. ricinus* und auf humanmedizinischen Seroprävalenzstudien (Oehme et al. 2002). Über die Involvierung anderer Zeckenarten und wild lebender Tiere in die Epidemiologie dieser Erreger ist bisher wenig bekannt.

Der Igel (*Erinaceus* spp.) ist ein fester Bestandteil ländlicher und städtischer Ökosysteme in Zentraleuropa (Zingg 1994, Riber 2006). In Siedlungsgebieten teilen sich die Tiere als Kulturfolger ihren Lebensraum mit dem Menschen. Besonders Habitate, in denen das Nahrungsangebot und Nistgelegenheiten kleinräumig ineinander übergehen, stellen eine ideale Lebensgrundlage für Igel dar. Ihre primären Lebensräume bilden daher heute vor allem

durchgrünte Siedlungsrandbereiche, Gärten und Parkanlagen, die eine bestimmte Strukturierung in Form von Hecken, Gebüsch, Bodendecker, Laub- und Reishighaufen aufweisen (Reeve 1994, Zingg 1994). In vorstädtischen Gegenden ist die Populationsdichte aufgrund des besseren Nahrungsangebotes höher als in weniger durch den Menschen geprägten Biotopen (Egli 2004).

Igel sind in den meisten europäischen Ländern ganzjährig geschützt. In Deutschland zählt der Igel nach dem Bundesnaturschutzgesetz (§44 BNatSchG, Stand: 25.02.2011) zu den besonders geschützten Arten, die weder gefangen noch verletzt oder getötet werden dürfen. Trotz dieser strikten Einstufung hinsichtlich des Artenschutzes dürfen kranke oder verletzte Tiere zur Pflege vorübergehend in menschliche Obhut genommen werden (§45 BNatSchG, Stand: 25.02.2011). Mittlerweile gilt der Igel als häufigstes behandeltes Wildtier in Tierarztpraxen (Beck 2007). Vor allem im Herbst werden kranke oder untergewichtige Igel, die mit einer Vielzahl von Parasiten befallen sein können, von Igelstationen oder Privatpersonen aufgenommen und intensiv betreut.

Der enge räumliche Kontakt des Igels sowohl zum Menschen als auch zu dessen Haustieren begünstigt eine Übertragung von Zoonosen. Das Infektionsrisiko besteht sowohl durch den direkten Kontakt (z.B. mit dem Hautpilz *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*) als auch durch die indirekte Übertragung von Erregern durch blutsaugende Arthropoden (Zecken, Flöhe, etc.) (Riley & Chomel 2005).

Zahlreiche parasitologische Studien zeigen, dass es zu einem häufigen Befall des Igels mit verschiedensten Endo- und Ektoparasiten kommt (Boag & Fowler 1988, Majeed et al. 1989, Lambert 2003 a, 2003 b, Beck & Pantchev 2005, Beck 2007, Pfäffle 2010). Allerdings liegt das Hauptaugenmerk auf Wurminfektionen oder igelspezifischen Parasitosen. Umfangreiche Studien über den Status des Igels als Reservoirwirt für Pathogene mit zoonotischer Relevanz sind bisher selten. Serologische Studien an Igeln belegen jedoch, dass der Igel durchaus in Kontakt mit Erregern kommt, die von gravierender zoonotischer Bedeutung sind. So konnten Sixl et al. (1989) bei Igeln Antikörper gegen *Coxiella burnetii*, Toxoplasmen und Leptospiren nachweisen.

In Igelstationen eingelieferte Igel sind oft mit mehreren Hundert Ektoparasiten, darunter vor allem Flöhe und Zecken, befallen. Sowohl alle 3 Entwicklungsstadien der Igelzecke (*Ixodes hexagonus*) als auch die des gemeinen Holzbocks (*I. ricinus*) können auf Igeln gefunden werden (Gray et al. 1994, Gern et al. 1997, Pfäffle et al. 2011). Durch eine gemeinsame Blutmahlzeit auf Igeln ist es prinzipiell möglich, dass eine Übertragung von Erregern von *I. ricinus* auf *I. hexagonus* (oder umgekehrt) stattfindet. Bedingt durch ihren

Lebensraum können Igel vektorübertragene Pathogene auch unmittelbar in Siedlungsnähe einschleppen, wodurch sich das potentielle Ansteckungsrisiko für Mensch und domestizierte Tiere erhöht.

## 1.1 Fragestellung und Zielsetzung

In epidemiologischen Untersuchungen steht der direkte Erregernachweis in Zecken (vor allem in generalistischen Zecken, wie *Ixodes ricinus*) im Vordergrund. Bei Tieren wird die direkte Detektion von Erregern hauptsächlich bei Haus- oder Nutztieren zur Absicherung eines Borrelioseverdachts durchgeführt. Über wild lebende Säugetiere gibt es bisher nur sehr wenige Daten zum Vorkommen von Pathogenen in deren Organen oder in den sie befallenden Zecken.

Für welche zeckenübertragenen Erreger der Igel empfänglich ist und als Reservoirwirt dient, wurde bisher nur ansatzweise untersucht. Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, den Stellenwert von Igeln in der Epidemiologie der von Zecken übertragenen Krankheiten zu bestimmen. Der Schwerpunkt lag dabei auf Borrelien einschließlich der Zuordnung bis zur jeweiligen Genospezies. Durch experimentelle und natürliche Infektionen sollte die Reservoirkompetenz bzw. das Reservoirpotential des Igels demonstriert und mittels Xenodiagnose bestätigt werden. Des Weiteren sollte die Funktion des Igels als Wirt für Anaplasmen, Rickettsien und FSME-Viren überprüft werden. Dabei lag der Fokus auf dem Wildtier selbst, insbesondere der molekularbiologischen Untersuchung der Organe. Aber auch von Igeln abgesammelte Zecken (*Ixodes hexagonus* und *I. ricinus*) sollten auf eine bakterielle Infektion mit den genannten Erregern untersucht werden.

Zusätzlich sollte evaluiert werden, ob sich auch serologisch Anhaltspunkte für die Involvierung von Igeln in der Epidemiologie von Borrelien und FSME-Viren finden lassen. Dabei sollte geklärt werden, ob für menschliche Serologie ausgelegte, kommerzielle Testsysteme auch für Igelseren adaptiert und verwendet werden können.

Solche grundlegenden Datenerhebungen sind wichtig, um ökologische Zusammenhänge zwischen zeckenassoziierten Erregern und ihrer Beziehung zu Wirten und Vektoren zu verstehen, und somit auch Informationen für das Risikomanagement zeckenübertragener Erreger zu gewinnen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zur Biologie und Ökologie von Igel (Erinaceidae)

#### 2.1.1 Systematik und Verbreitung

Lange Zeit wurden Igel mit anderen insektenfressenden Säugern in die Ordnung Insectivora (oder Lipotyphla) eingeordnet (Hutterer 1993). Neuere genetische Untersuchungen befürworten jedoch die systematische Eingliederung der Erinaceidae in die eigenständige Ordnung Erinaceomorpha, wie es bereits 1910 von Gregory vorgeschlagen wurde (Hutterer 2005). Diese Ordnung besteht aus der Familie der Erinaceidae, die sich in die Unterfamilien der Haarigel (*Galaricinae*) und der Stacheligel (*Erinaceinae*) aufgliedert.

Die Unterfamilie der *Erinaceinae* umfasst 5 Gattungen: *Atelerix*, *Erinaceus*, *Hemiechinus*, *Mesechinus* und *Paraechinus* (Reeve 1994). Die Arten der Gattung *Atelerix* sind hauptsächlich über den afrikanischen Kontinent verbreitet, mit einigen Ausnahmen im Mittelmeergebiet (Kanaren, Balearen und an der spanischen und französischen Ostküste), wo sie eingeschleppt wurden (Reeve 1994). Die Verbreitung des Langohrigels *Hemiechinus* erstreckt sich insbesondere über den asiatischen Raum. Wüstenigel (*Paraechinus*) kommen in der Sahara über die arabische Region bis hin nach Indien vor (Corbet 1988). Steppenigel (*Mesechinus*) findet man in Zentralasien mit nativen Verbreitungsgebieten in Russland, China und der Mongolei. Die Verbreitung von Tieren der Gattung *Erinaceus* wird im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben.

#### 2.1.2 Kleinohrigel (*Erinaceus* spp.)

Die Gattung der Kleinohrigel (*Erinaceus*) besteht aus 4 Arten: *Erinaceus amurensis*, *E. concolor*, *E. europaeus* und *E. roumanicus*. Das Vorkommen von *E. roumanicus* und *E. concolor* ist auf den asiatischen Raum beschränkt (Abbildung 1 B & Abbildung 2 B).

Das natürliche Verbreitungsgebiet des Europäischen Braunbrustigels (*E. europaeus*, auch westeuropäischer Igel oder Westigel genannt) umfasst im Wesentlichen ganz Westeuropa. Es erstreckt sich von Irland und den Britischen Inseln, über den Mittelmeerraum bis hin zur östlichen Begrenzungslinie zwischen Odermündung und Istrien sowie von Südkandinavien bis zum Nordwesten Russlands (Holz & Niethammer 1990, Sommer 2007) (Abbildung 2 A).

Von englischen Siedlern wurde *E. europaeus* in den 1870er Jahren auch nach Neuseeland eingeschleppt (Reeve 1994). In Deutschland ist fast ausschließlich diese Art zu finden, lediglich in Teilen Ostdeutschlands kann auch der in Osteuropa endemisch vorkommende Weißbrustigel (*E. roumanicus*, auch nord-osteuropäischer Weißbrustigel oder Ostigel genannt) vereinzelt nachgewiesen werden (Abbildung 1 A). Die Systematik dieser Igelart steht bis heute zur Diskussion: bis vor Kurzem wurde *E. roumanicus* in der Literatur auch häufig als *E. concolor* bezeichnet und mit dem süd-osteuropäischen Weißbrustigel (*E. concolor*) in einer Gruppe geführt, was aufgrund phylogenetischer Analysen nicht gestützt wurde (Hutterer 2005, Sommer 2007).

Sympatrisch kommen *E. europaeus* und *E. roumanicus* in Polen, Tschechien und Österreich bis an das Mittelmeer vor (Holz & Niethammer 1990, Hutterer 2005). Neuesten Untersuchungen zufolge kann es in diesem Gebiet auch zur Hybridisierung von *E. europaeus* und *E. roumanicus* kommen (Bogdanov et al. 2009).

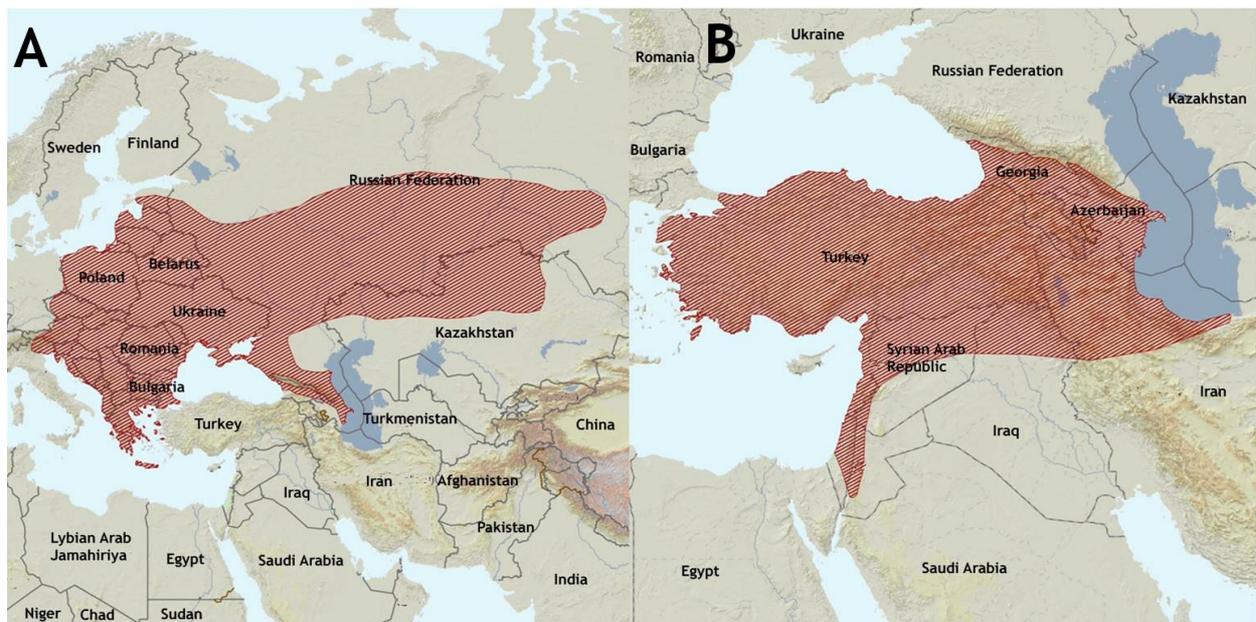


Abbildung 1: Natürliches Verbreitungsgebiet von *Erinaceus roumanicus* (A) und *E. concolor* (B). Rot markierte Bereiche kennzeichnen die Gebiete des endemischen Vorkommens (modifiziert nach IUCN Red list: <http://www.iucnredlist.org>).

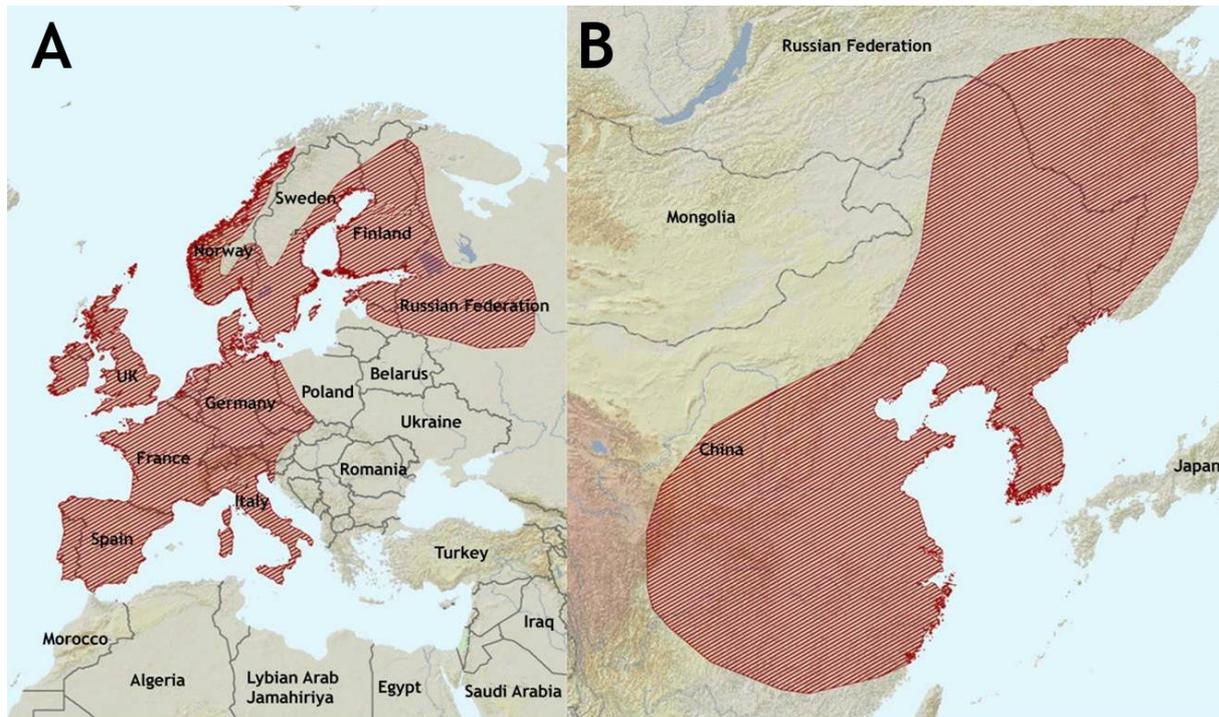


Abbildung 2: Natürliches Verbreitungsgebiet von *Erinaceus europaeus* (A) und *E. amurensis* (B). Rot markierte Bereiche kennzeichnen die Gebiete des endemischen Vorkommens (modifiziert nach IUCN Red list: <http://www.iucnredlist.org>).

### 2.1.3 Zur Biologie und Ökologie des Europäischen Igels

Charakteristisch und namensgebend für Stacheligel sind die Stacheln, die die Haare an der Rückenseite ersetzen. Igel gehören zu den dämmerungs- und nachtaktiven Insektenfressern und bevorzugen bezüglich ihres Lebensraumes Gebiete mit ausreichendem Nahrungsangebot und guten Versteckmöglichkeiten (Schicht-Tinbergen 1989). Man findet sie daher oft in ländlichen Siedlungsgebieten mit viel Unterholz und Gestrüpp sowie in Gärten, aber auch in urbanen Gegenden mit Anlagen und Parks (Schicht-Tinbergen 1989, Reeve 1994).

Bedingt durch sein Einrollvermögen und sein Stachelkleid, hat der Igel nur wenige natürliche Feinde. Dazu gehören größere Greifvögel, die die Stacheln ohne Mühe mit ihren Fängen durchdringen können (Schicht-Tinbergen 1989). Der Europäische Uhu (*Bubo bubo*) spielt unter den Raubvögeln die wichtigste Rolle als Feind für den Igel (Schicht-Tinbergen 1989). Iltis, Marder, Fuchs und Dachs erbeuten gelegentlich Igel. Geschwächte, nicht vollkommen eingerollte und juvenile Igel fallen teilweise Hunden und Katzen zum Opfer (Schicht-Tinbergen 1989). Im Winterschlaf können auch andere Kleinsäuger, z.B. Ratten oder Mäuse, schlafende Igel annagen (Schicht-Tinbergen 1989).

Igel sind Einzelgänger und sehr ortstreu (Schicht-Tinbergen 1989). Dennoch kann ihr Aktionsraum erheblich variieren (Reeve 1994). In urbanen und suburbanen Gebieten ist ihr Bewegungsradius meist kleiner als in ländlichen Gebieten. Boitani & Reggiani (1984) ermittelten Territoriengrößen von 5,5 ha bis 102,5 ha, die sich auch mit Revieren von anderen Igelarten überlagern können. Reeve (1994) listet Aktionsräume von verschiedenen europäischen Studien auf, die für männliche *E. europaeus* deutlich höher sind als für weibliche *E. europaeus*. Aufgrund des großen Aktionsradius besitzen Igel in ihrem Revier oft mehrere Nester, die sie während des Tageschlafes und in unterschiedlichen Abständen aufsuchen (Schicht-Tinbergen 1989). Dabei unterscheidet man zwischen Sommer- bzw. Tagesnestern, die relativ strukturlos gebaut sind, und Geburts- und Winternestern, die mit verschiedenen Nistmaterialien aus pflanzlichen Bestandteilen wie Moos, Laub, Gras sehr gut gegen Regen und Schmelzwasser sowie gegen Kälte und Wärme isoliert sind (Schicht-Tinbergen 1989, Reeve 1994).

Ein besonderes Merkmal ist der Winterschlaf, der bei adulten Männchen von Ende Oktober bis etwa Ende April oder Mai, je nach geografischer Verbreitung variierend, dauert. Adulte Weibchen begeben sich aufgrund der Jungenaufzucht meist erst Ende November in den Winterschlaf. Durchschnittlich 5 bis 6 Monate verbringt ein gesunder Igel im Winterschlaf (Schicht-Tinbergen 1989).

Im Spätjahr befinden sich adulte Igel bei einer Außentemperatur zwischen 15 °C und 17 °C zunächst in einen „halb wachen“ Zustand, der unterhalb von 14,5 °C kontinuierlich in Lethargie übergeht. Mit Abnahme der Umgebungstemperatur sinkt auch die Körpertemperatur sukzessiv und liegt stets etwa 1 °C über der Umgebungstemperatur. Bei weiter fallenden Außentemperaturen (unter 5 °C) pendelt sich die Körpertemperatur auf ca. 6 °C ein.

Während des Winterschlafes kommt es zu drastischen physiologischen Veränderungen. Der Herzschlag wird von 200-280 Schlägen auf 5 Schläge pro Minute gedrosselt, die Atemfrequenz von 50 auf 13 pro Minute (Reeve 1994). Die Körpertemperatur sinkt von ca. 35-36 °C auf 1-6 °C (Reeve 1994). Während des Winterschlafes kann es zu einem Gewichtsverlust von mehr als 35 % kommen (Lienhardt 1979).

Winterschläfer erwachen während ihres Schlafes in unregelmäßigen Abständen und regulieren dabei ihre Körpertemperatur wieder auf Normaltemperatur hoch (Prendergast et al. 2002). Abhängig von der Tierspezies variieren diese Intervalle zwischen 2 und 30 Tagen (Prendergast et al. 2002). Igel (*E. europaeus*) wachen durchschnittlich alle 7 bis 10 Tage auf; gewöhnlich bleiben sie in ihrem Nest und setzen den Winterschlaf nach wenigen Stunden

wieder fort, können aber auch mehrere Tage aktiv sein und das Nest wechseln (Reeve 1994). Auch wenn die Gründe für diese Unterbrechungen des Winterschlafes vielfältig diskutiert wurden, besteht bis heute keine einheitliche Meinung darüber (Prendergast et al. 2002). Bis zum Aufwachen im Frühjahr können bis zu 80 % des Energiedepots verbraucht werden, was bei einem unzureichenden Winterschlafgewicht auch zum Tod führen kann (Kristiansson 1990).

Igel erreichen ihre Geschlechtsreife mit ca. 8 bis 10 Monaten. Hahn (1986) konnte allerdings bei in freier Wildbahn lebenden Igel eine erfolgreiche Fortpflanzung nie vor dem zweiten Lebensjahr beobachten. Die Paarungszeit in den gemäßigten Breiten beginnt im Frühling, bevorzugt im Mai und Juni. Die Trächtigkeitsdauer beträgt etwa 32 bis 36 Tage (Schicht-Tinbergen 1989). Die Geburt der Jungen findet hauptsächlich im August und September statt (Schicht-Tinbergen 1989). In warmen Gegenden Deutschlands, wie der Rheinebene, konnten aber auch schon Geburten im Juni beobachtet werden (Neumeier 2001). Ein Wurf umfasst durchschnittlich 4-6 Junge. Die Jungen werden bis etwa 6 Wochen von der Mutter gesäugt (Schicht-Tinbergen 1989) und verlassen dann das Nest. Ihr ursprüngliches Geburtsgewicht von 8-25 g haben sie dann auf 200-235 g erhöht (Reeve 1994). Danach verteilen sich die Jungigel und fressen sich das notwendige Gewicht für den Winterschlaf an. Spätgeborene schaffen es oft nicht, das nötige Fettdepot für den Winterschlaf aufzubauen, und fallen daher erst spät oder gar nicht in den Winterschlaf.

Das Gewicht eines adulten Igels liegt zwischen 700 und 1400 g (Schicht-Tinbergen 1989). Über das notwendige Gewicht für den Winterschlaf existieren unterschiedliche Annahmen: als Faustregel gilt häufig ein Mindestgewicht von 500 g (Esser 1984).

Die Angaben zur Lebenserwartung variieren in der Literatur. In England und Schweden wird als durchschnittliche Lebenserwartung 2 Jahre vermutet (Kristiansson 1990, Reeve 1994), Schicht-Tinbergen (1989) gibt für Deutschland 3 bis 7 Jahren an, während Isenbügel (1976) sogar Altersangaben von bis zu 10 Jahren in Gefangenschaft und 8 Jahren in Freiheit macht. Lienhardt (1979) geht davon aus, dass in der freien Wildbahn kaum ein Igel älter als 3 Jahre wird.

### 2.1.4 Ektoparasiten und vektorassoziierte Erreger des Igels

Als Vektoren für verschiedene Erreger kommen beim Igel in erster Linie Flöhe, Milben und Zecken in Betracht.

#### Flöhe

Fast alle Igel, die in einer Tierarztpraxis vorgestellt werden, sind mit Flöhen befallen. Selbst kleinste Igel hatten in der Untersuchung von Schicht-Tinbergen (1989) über 100 Flöhe. Saupe (1988) gibt sogar Befallsmaxima von nahezu 1000 Exemplaren pro Igel an. Dabei wird zu fast 100 % der spezifische Igelfloh *Archaeopsylla erinacei* nachgewiesen (Abbildung 3). Vereinzelt werden auch andere Arten, wie der Hundefloh *Ctenocephalides canis*, der Katzenfloh *Ctenocephalides felis*, der Rattenfloh *Nosopsyllus fasciatus*, der Hühnerfloh *Ceratophyllus gallinae*, der Vogelfloh *Ceratophyllus garei*, der Kleinsäugerfloh *Typhloceras poppei* und der weniger spezialisierte Säugetierfloh *Ctenophthalmus agyrtes* gefunden (Saupe 1988, Schicht-Tinbergen 1989, Visser et al. 2001, Beck & Pantchev 2005, Mrohs 2011). Der Igelfloh befällt auch andere Säuger wie Iltis, Fuchs und Wanderratte: er kann mitunter auch Menschen stechen und Ursache für Hautveränderungen sein (Bork et al. 1987). Sowohl weibliche als auch männliche Flöhe saugen Blut und können somit Erreger übertragen. Erst kürzlich konnte in 100 % der untersuchten Igelflöhe (*A. erinacei*) der Erreger *Rickettsia felis* bzw. eine nahe verwandte Art, nachgewiesen werden (De Sousa et al. 2006, Gilles et al. 2008, 2009). Möglicherweise spielen Igelflöhe auch eine Rolle in der Epidemiologie von *Bartonella* spp. (Just et al. 2008).



Abbildung 3: Igelflöhe (*Archaeopsylla erinacei*). Links: männlich; rechts: weiblich. Foto: Jasmin Skuballa.

## Milben

Neben der Nagemilbe *Caparinia tripilis*, können auch die Haarbalmilbe *Demodex erinacei* und Grabmilben der Gattung *Sarcoptes* und *Notoedres* auf Igel n parasitieren (Saupe 1988, Reeve 1994, Lambert 2003 b). Diese Milbenarten werden als Transportwirte für den zoonotischen Hautpilz *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*, dessen Sporen an der Körperoberfläche der Milben angeheftet sein können, angesehen (Isenbügel 1976). Der Igel wird daneben auch von parasitisch lebenden Laufmilben der Familie Laelapidae und Haemogamasidae befallen (Reeve 1994).

Im Herbst können gelegentlich Larven der Gras- oder Erntemilbe *Neotrombicula autumnalis* als orangefarbene Nester auf Igel n beobachtet werden (Abbildung 4). Auch der Mensch kann zufällig beim Aufenthalt in Milbenhabitaten befallen werden, was sich in Form von Juckreiz und Sekundärinfektionen äußern kann. Ob die einheimischen Trombiculiden auch als Vektoren für Pathogene dienen, ist bisher nicht genau bekannt. Die Larven saugen Blut und spielen eventuell in der Epidemiologie von Borrelien eine, wenn auch untergeordnete, Rolle (Kampen et al. 2004 a). Tropische und subtropische Verwandte dieser Milbenart sind seit Langem als Überträger des Tsutsugamushi-Fiebers bekannt (Ogawa & Ono 2008).



Abbildung 4: Befall mit *Neotrombicula autumnalis* (mehrere Hundert orangefarbene Larven als „Nest“) am Hinterbein eines Igels. Foto: Jasmin Skuballa.

## **Zecken**

In Mitteleuropa sind alle Entwicklungsstadien der Igelzecke *Ixodes hexagonus* und des Gemeinen Holzbocks *Ixodes ricinus* auf Igel zu finden (Gern et al. 1997, Pfäffle et al. 2011). Eine ausführliche Beschreibung dieser beiden Zeckenarten wird in Kapitel 2.2 vorgenommen. Gelegentlich wird auch *Ixodes trianguliceps* auf Igel nachgewiesen (Walter 1981). Smith (1968) listet des Weiteren die Zeckenarten *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor sinicus*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis numidiana*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus bursa* bei Igel auf.

Im Vergleich zu *I. ricinus* wurde die Vektorkompetenz der Igelzecke (*I. hexagonus*) bisher lediglich für wenige Erreger, darunter FSME-Viren (Krivanec et al. 1988) und *B. burgdorferi* s.l. (Liebisch et al. 1989, Gern et al. 1991, 1997), erforscht. Im Nordwesten Spaniens wird *I. hexagonus* als Hauptüberträger von *Theileria annae* angesehen, einer Erkrankung bei Hunden (Camacho et al. 2003). In den Niederlanden wurde *Anaplasma phagocytophilum* und *Rickettsia helvetica* aus *I. hexagonus* isoliert (Nijhof et al. 2007). Allerdings sind die Untersuchungen nur punktuell, da *I. hexagonus* nicht durch „Flaggen“ in der freien Umgebung gefunden wird, sondern ausschließlich auf den Wirtstieren und in deren Nestern. Insgesamt ist die Informationsbasis über *I. hexagonus* als Vektor als unzureichend anzusehen. Gleiches gilt für den Igel als Reservoir für verschiedene vektorassoziierte Pathogene.

## **Weitere Vektoren und vektorassoziierte Erreger des Igels**

Obwohl die Datenlage bisher nur sehr lückenhaft ist, belegen die wenigen Studien, dass Igel auch an der Verbreitung weiterer vektorübertragener Erreger beteiligt sind (Riley & Chomel 2005). Die Igelart *Hemiechinus auritus* gilt als Reservoirwirt für das Pappataci-Fieber („sandfly fever“), dessen Erreger zur Familie der Bunyaviridae gehört und von Sandmücken (*Phlebotomus* spp.) übertragen wird (Krauss et al. 2003). Serologische Positivbefunde deuten auch auf *Erinaceus*-Arten als Reservoir hin (Gařdamovich et al. 1990). Der Igel (*E. roumanicus*) wird außerdem als möglicher Reservoirwirt für weitere Bunyaviren, wie beispielsweise des Tahyna-Virus (Le Duc 1979) oder des Bhanja-Virus diskutiert (Hubálek 1987). Des Weiteren bestehen serologische Indizien dafür, dass Igel auch eine Rolle in der Epidemiologie von *Rickettsia conorii* und *Coxiella burnetii* spielen (Le Gac 1974, Sixl et al. 1989).

## 2.2 Zur Biologie und Ökologie von Zecken (Ixodidae)

### 2.2.1 Systematik und Verbreitung

Zecken gehören innerhalb der Klasse der Arachnida (Spinnentiere) zu der Ordnung Acari (Milben) und werden in 3 Familien eingeteilt: Ixodidae (Schildzecken), Argasidae (Lederzecken) und die Familie Nuttalliellidae mit der einzig bekannten Art *Nuttalliella namaqua*, die bislang nur in Afrika gefunden wurde (Sonenshine 1993, Horak 2009). Die mehr als 900 beschriebenen Zeckenarten sind an die verschiedensten Ökosysteme angepasst und bevölkern beispielsweise feuchte und tropische Wälder, Graslandschaften und Wüsten sowie fernab gelegene Inseln mit Seevogelkolonien (Dautel & Kahl 1999, Barker & Murrell 2004, Dautel 2010). Die Verbreitung von Zecken ist sowohl von biotischen als auch von abiotischen Faktoren abhängig (Dautel 2010). Zecken sind sehr temperaturabhängig. So existieren eine untere und eine obere Letaltemperaturgrenze, die ausschlaggebend für die jeweilige Verbreitung ist (Dautel 2010).

Schildzecken stellen mit ca. 13 Gattungen und ca. 700 Arten die größte der 3 Familien (Oliver 1989, De la Fuente & Kocan 2006). Namensgebend ist der charakteristische Rückenschild (Scutum).

In Mitteleuropa wurden bislang 19 Zeckenarten aus 5 Gattungen beschrieben (Liebisch & Rahman 1976, Petney et al. 2011). Die meisten Arten gehören zur Familie der Ixodidae, wovon 4 Gattungen in Deutschland vorkommen (*Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*) (Petney et al. 2011). Häufig werden Zecken aus dem Ausland eingeschleppt, wie z.B. die „Braune Hundezecke“ *Rhipicephalus sanguineus* durch den Transport von Hunden aus dem Mittelmeerraum, die sich derzeit, soweit bekannt, noch nicht im Freiland in den gemäßigten Breiten halten kann (Kimmig et al. 2010). Auch durch Zugvögel können Zecken verschleppt werden (Plokarz 2010, Elfving et al. 2010).

### 2.2.2 Lebensweise und Ökologie

Alle Zecken ernähren sich von Wirbeltierblut. Während Lederzecken in kurzer Zeit (Minuten bis Stunden) wiederholt relativ kleine Blutmengen saugen, nehmen die Schildzecken nur einmal in jedem Entwicklungsstadium (Larve, Nymphe, adulte weibliche Zecke) über mehrere Tage eine große Blutmahlzeit auf. Die meisten Schildzecken gehören zu den

mehrwirtigen Zecken und benötigen daher für ihre komplette Entwicklung mehrere Blutmahlzeiten an verschiedenen Wirbeltieren (Wilson 1994). Bei jedem Saugakt können die Zecken Erreger an einen Wirt abgeben oder von diesem aufnehmen. Innerhalb der blutsaugenden Arthropoden übertragen Zecken die größte Vielfalt an Krankheitserregern, darunter virale, bakterielle, einzellige und mykotische Organismen (Aspöck 2008).

Ausschlaggebend für die aktive Wirtssuche ist die Temperatur. Wie andere Arthropoden auch, haben Zecken verschiedene Mechanismen entwickelt, um sich an saisonale oder tageszeitliche Temperaturschwankungen anzupassen (Dautel 2010). Hierzu gehören insbesondere Dormanzen (Ruhephasen), die das Überdauern unter ungünstigen Lebensverhältnissen (z.B. bei extremer Hitze oder Kälte) gewährleisten (Dautel 2010).

Die meisten Zeckenarten sind streng wirtsspezifisch und werden nur an bestimmten wild lebenden Säugetieren und Vögeln oder in deren Bauten und Nestern gefunden (Liebisch 1991, Petney et al. 2011). Beispielsweise befällt *Ixodes vespertilionis* nur Fledermäuse (Siuda et al. 2009), andere Arten wie *Ixodes arboricola* sind stärker auf Vögel spezialisiert (Schilling et al. 1981). *Ixodes ricinus* weist dagegen kein strenges Wirtsspektrum auf und befällt mehr als 300 Wirbeltierarten aus verschiedenen Klassen. Als polyphage Zeckenart spielt sie deshalb eine zentrale Rolle in der Verbreitung der Lyme-Borreliose und anderer zeckenübertragener Krankheiten (Faulde & Hoffmann 2001, Stanek 2005, Aspöck 2008, Reis et al. 2010).

### **2.2.3 Morphologie von *Ixodes* spp.**

Der dorsoventral abgeflachte Körper von Schildzecken gliedert sich in das Capitulum mit den Mundwerkzeugen sowie das Idiosoma, welches sich aus dem die Beine tragenden Podosoma und dem Opisthosoma (Abdomen) zusammensetzt (Sonenshine 1993). Die Mundwerkzeuge bestehen aus den außen liegenden Pedipalpen, einem Paar Chelizeren und dem unbeweglichen, mit Widerhaken besetzten Hypostom (Sonenshine 1993, Hillyard 1996). Als Spinnentiere besitzen Zecken 4 Beinpaare, mit Ausnahme der Larven mit lediglich 3 Beinpaaren.

Charakteristisch für die Familie der Ixodidae ist das Rückenschild (Scutum), das neben den Mundwerkzeugen als wichtiges Bestimmungsmerkmal herangezogen wird. Bei den Männchen reicht das Scutum über das ganze Idiosoma, während es bei Weibchen, Nymphen und Larven nur das vordere Drittel einnimmt. Dadurch erscheint der etwa 2,6 mm lange Körper eines *Ixodes ricinus* Männchens in seiner Färbung einheitlich schwarzbraun. Das Idiosoma des Weibchens von *I. ricinus* ist im nüchternen Zustand meist rötlich gefärbt, kann

aber nach der Blutmahlzeit von braungrau bis hin zu beige variieren. Während des Saugakts kann die Körperlänge eines *I. ricinus* Weibchens von ursprünglich etwa 3,3 mm im nüchternen Zustand auf bis zu 1,1 cm anwachsen (Hillyard 1996). *Ixodes hexagonus* Stadien sind im Allgemeinen etwas größer als *I. ricinus* Stadien (vgl. Abbildung 5). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal ist die Färbung und Form der Extremitäten. Bei *I. ricinus* sind die Beinpaare meist schwarzbraun, bei *I. hexagonus* dagegen oft rotbraun. Die Körperfärbung adulter *I. hexagonus* Weibchen variiert zwischen cremeweiß und stahlgrau.

Bei adulten *Ixodes* spp. liegt die Geschlechtsöffnung im vorderen Drittel, zwischen den Coxen des vierten Beinpaars (Hillyard 1996). Larven und Nymphen besitzen keine Geschlechtsöffnung und sind daher geschlechtlich noch nicht differenzierbar. In Abbildung 5 sind die Entwicklungsstadien von *I. ricinus* und *I. hexagonus* vergleichend abgebildet.



Abbildung 5: Vergleich der Entwicklungsstadien von *Ixodes hexagonus* (obere Reihe) und *I. ricinus* (untere Reihe). Von links nach rechts: Larven, Nympe, Weibchen, Männchen. Scharzer Balken=3 mm. Foto: Jasmin Skuballa.

## 2.2.4 *Ixodes ricinus*

### 2.2.4.1 Verbreitung und Ökologie

*Ixodes ricinus* ist die häufigste Zeckenart in Mitteleuropa (Gern & Humair 2002, Stanek 2005, Aspöck 2008). Das geografische Verbreitungsgebiet von *I. ricinus* ist an gemäßigte Klimazonen gebunden. Es erstreckt sich vom Atlasgebirge in Nordafrika bis etwa zum 65. Breitengrad nördlich in Skandinavien und bis zum 60. Längengrad östlich in Zentralasien (Hillyard 1996). Im östlichen Verbreitungsgebiet kommt es zur Überschneidung mit dem Areal der nahe verwandten Zeckenart *Ixodes persulcatus*. Innerhalb dieser geografischen Verbreitung ist das lokale Vorkommen auf Gebiete mit hoher Luftfeuchte während des gesamten Jahres begrenzt (Donnelly 1987). Hinsichtlich des Höhenvorkommens wurde das Vordringen von *I. ricinus* von 700 m Ende der 1970er Jahre auf 1100 m nach der Jahrtausendwende beobachtet (Dautel 2010).

Wie alle Schildzeckenarten durchläuft *I. ricinus* mehrere Entwicklungsstadien vom Ei über Larve und Nymphe bis hin zur adulten Zecke (Abbildung 6). Jedes Stadium benötigt für seine Entwicklung ungefähr 1 Jahr (Gray 1991). Daher erstreckt sich der komplette Entwicklungszyklus in der Natur durchschnittlich über 3 Jahre, kann aber je nach geografischer Lage auch zwischen 2 und 6 Jahren variieren (Gray 1991).

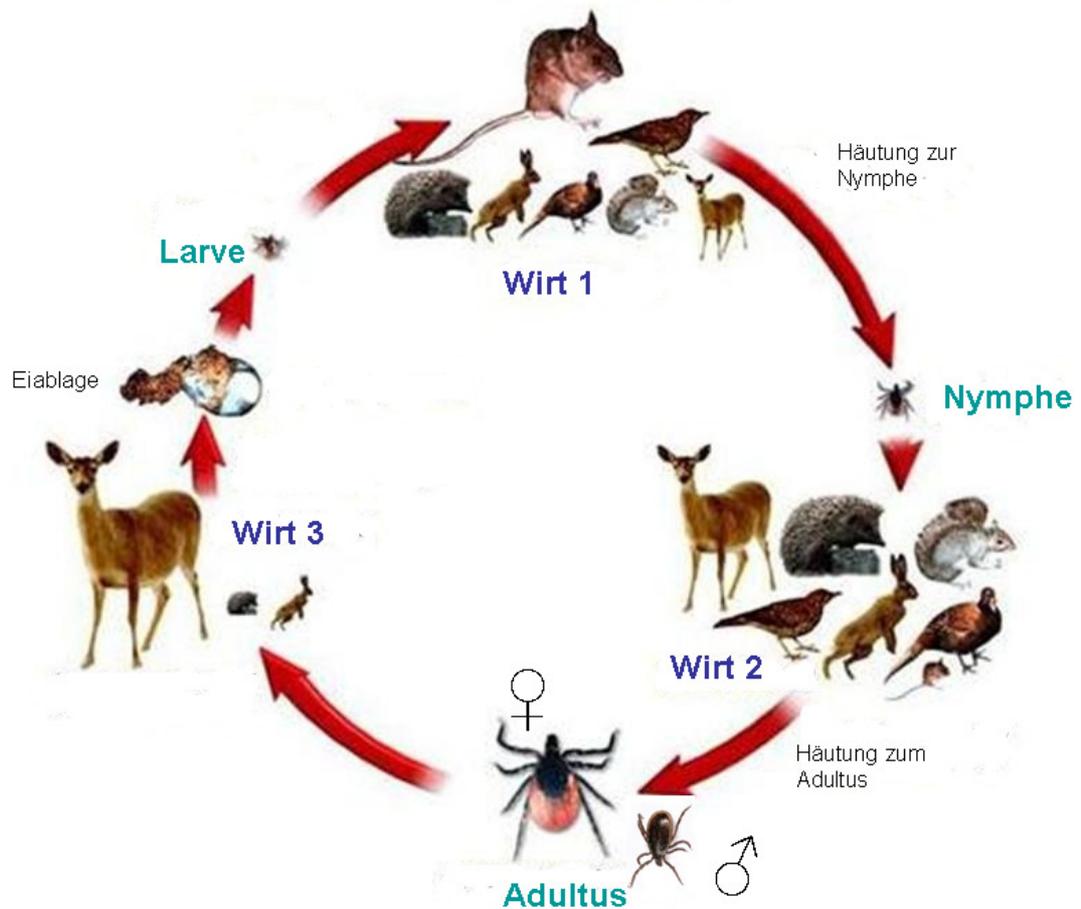


Abbildung 6: Entwicklungszyklus von *Ixodes ricinus*. Die relative Größe der abgebildeten Wirtstiere spiegelt die Bedeutung als Wirt für die einzelnen Stadien wider. Quelle: EUCALB 1997-2005. European Union Concerted Action on Lyme-Borreliosis. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Jeremy Gray und Bernard Kaye (<http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php>; Stand: 20.11.2010, modifiziert).

Die verschiedenen Entwicklungsstadien der Zecken bevorzugen unterschiedliche Wirte und halten sich in der Vegetation in verschiedenen Höhen auf. Larven findet man vor allem in Bodennähe, weshalb sie vornehmlich an kleineren Säugern parasitieren. In einem typischen Waldhabitat sind Mäuse für Larven die wichtigsten Wirte; Nymphen kommen auf verschiedenen Wirbeltierspezies vor und für adulte Weibchen sind Rehe als Blutlieferant für die Eiproduktion wichtig. Alle 3 Stadien von *I. ricinus* können auf Igelvorkommen (Abbildung 6).

Nach jeder Blutmahlzeit lassen sich die Larvalstadien wieder vom Wirt abfallen und häuten sich am Boden innerhalb weniger Monate zum nächsten Stadium. Die Begattung der Weibchen findet auf der Vegetation oder auf dem Wirt statt. Männchen von *I. ricinus* saugen

meist nicht und nehmen gegebenenfalls nur kleine Mengen Blut und Gewebsflüssigkeit auf, während Weibchen die Blutmahlzeit für die anschließende Eiablage benötigen. Die Weibchen legen in der Vegetation 2000-3000 Eier und sterben danach (Hillyard 1996).

*I. ricinus* macht in Mitteleuropa mehr als 90 % der gesamten Zeckenfauna aus (Kimmig et al. 2010). Der Holzbock bevorzugt Biotope mit einem humosen und leicht sauren Boden, der durch einen krautigen Bewuchs und eine Deckschicht aus abgestorbenem Laub- und Pflanzenmaterial gekennzeichnet ist (Kurtenbach et al. 1995). Nadel-, Laub- und Mischwälder mit viel Unterholz und bodennahem Bewuchs stellen zum einen ein geeignetes Habitat für die Zecke selbst dar, sind aber gleichzeitig auch ein hervorragendes Biotop für ihre Wirtstiere, wie Rotwild, Schwarzwild und kleine Säugetiere (Gray 2002, Stanek 2005).

Das Mikroklima direkt am Boden, insbesondere die hohe relative Luftfeuchte, unterscheidet sich im Allgemeinen stark vom vorherrschenden Makroklima der Region und ist für das Überleben und die Aktivität wirtssuchender Zecken entscheidend (Daniel & Dusbabek 1994, Perret et al. 2000). *I. ricinus* ist stark feuchtigkeitsabhängig und kann ausschließlich in Biotopen überleben, in denen die relative Luftfeuchtigkeit an der Basis der Vegetation nur selten unter 85 % absinkt (MacLeod 1935, Gray 2002).

Auf dem europäischen Festland können häufig 2 charakteristische saisonale Häufigkeitsmaxima (bimodales Aktivitätsmuster) von *I. ricinus* beobachtet werden: der erste „Frühjahrspeak“ liegt meistens zwischen März und Juni, der zweite, weniger stark ausgeprägter „Herbstpeak“ zwischen August bis Oktober (Donnelly 1987, Kurtenbach et al. 2006). In einigen Regionen, wie z.B. im Süden von England und in Irland kann es aber auch nur zu einem Peak (unimodales Aktivitätsmuster) kommen (Kurtenbach et al. 2006).

Neben der relativen Luftfeuchte bestimmt auch die Temperatur die saisonale Aktivität und die Abundanz wirtssuchender Zecken. Die letale Temperatur von *I. ricinus* liegt unterhalb  $-15^{\circ}\text{C}$  sowie etwas oberhalb von  $30^{\circ}\text{C}$  (Dautel 2010).

*I. ricinus* nutzt wie die meisten Zeckenarten eine passive Strategie zur Wirtsfindung (Sonenshine 1993). Dabei nehmen wirtssuchende Zecken eine typische Lauerstellung („questing“) auf der Vegetation (z.B. an der Spitze eines Grashalmes) ein, bei der sie das vordere Beinpaar charakteristisch ausstrecken (Sonenshine 1993). An den Vorderbeinen befindet sich das Hallersche Organ, eine kleine Grube mit Sinneshaaren, womit Zecken mechanische, thermische und chemische Reize wahrnehmen können. Dabei sind Erschütterungen und das vom Wirt abgegebene Kohlendioxid besonders hervorzuheben (Sonenshine 1993). Kommt ein Wirtstier vorbei, lässt sich die Zecke abstreifen und sucht auf dem Körper des Wirtes nach einer geeigneten Stichstelle.

### 2.2.5 *Ixodes hexagonus*

Die Zeckenart *Ixodes hexagonus* ist durch ihre starke Wirtsassoziation mit Igel in Volksmund auch unter dem Namen „Igelzecke“ bekannt. Der wissenschaftliche Name „*hexagonus*“ ist auf das sechseckig geformte Scutum zurückzuführen.

#### 2.2.5.1 Verbreitung und Ökologie

Zecken mit einer stark ausgeprägten Wirtsspezifität sind stark an die Verbreitung ihrer Wirtstierart(en) gebunden (Dautel 2010). Das Vorkommen von *Ixodes hexagonus* deckt sich daher im Wesentlichen mit dem Verbreitungsgebiet der bevorzugten Wirte, Igelarten der Gattung *Erinaceus* (siehe Kapitel 2.1.1). *I. hexagonus* wird über Westeuropa bis hin zur Türkei gefunden und kommt in vielen Teilen Europas sympatrisch mit *Ixodes ricinus* vor (Krivanec et al. 1988, Gern et al. 1997, Aktas et al. 2010).

Wie *I. ricinus* gehört auch *I. hexagonus* zu den dreiwirtigen Zeckenarten, ist aber aufgrund ihrer ausgeprägten Wirtsspezifität fast ausschließlich auf Igel zu finden. Daneben dienen hundeartige Raubtiere wie Füchse (Canidae) und Marder (Mustelidae) als natürliche Wirte (Arthur 1963, Dautel & Kahl 1999, Christian 2010). In Siedlungsgebieten werden des Öfteren Hunde und Katzen (Beichel et al. 1996, Ogden et al. 2000, Nijhof et al. 2007) und sehr selten auch der Mensch befallen (Liebisch et al. 1998, Estrada-Peña & Jongejan 1999)..

Die meiste Zeit ihres Lebens verbringen die Entwicklungsstadien dieser Zecke in den Nestern/Bauten ihrer Wirte (Dautel & Kahl 1999). Dieser Lebensraum hat den Vorteil, dass dort ein direkter Kontakt mit dem Wirtstier besteht sowie eine konstante Temperatur und erhöhte Luftfeuchte herrscht, die essentiell für das Überleben und die Entwicklung der Zecke ist (Honzakova 1973, Dautel & Kahl 1999). Aufgrund dieser Lebensweise wird *I. hexagonus* nur wenig von äußeren abiotischen Faktoren beeinflusst.

Als Kulturfolger schleppt der Igel diese Zeckenart in urbane und suburbane Gebiete ein, weshalb *I. hexagonus* sowohl in Gärten und Stadtparks als auch in Brachland und Laubwäldern weit verbreitet ist. Obwohl Fuchs- und Marderpopulationen in den letzten Jahren in Stadtgebieten stark zunehmen, wird bislang der Igel als Hauptwirt in städtischen Gebieten angesehen (Dautel & Kahl 1999).

Die Entwicklung vom Ei bis zur adulten Zecke kann unter Laborbedingungen bei 22-23°C innerhalb von 2 Monaten abgeschlossen sein (Toutoungi et al. 1993). Unter natürlichen

Bedingungen erstreckt sich der Entwicklungszyklus aber vermutlich über mehrere Jahre (Dautel & Kahl 1999). Toutoungi et al. (1993) stellten fest, dass die meisten Larven erst nach 11 Monaten bereit sind, am Wirtstier Blut zu saugen. Frisch aus dem Ei geschlüpfte Larven konnten im Labor in einem Glasröhrchen bei 15 °C und 97 % relativer Luftfeuchte mehr als 6 Jahre überleben (Dautel & Kahl 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *I. hexagonus* in einem geeigneten Mikrohabitat auch eine entsprechend lange Zeit ohne eine Blutmahlzeit auskommen kann (Dautel & Kahl 1999).

Die medizinische Bedeutung von *I. hexagonus* als Überträger von Erregern wird als gering eingestuft, da sie selten Menschen sticht (Arthur 1963, Dautel & Kahl 1999). Die Igelzecke kommt jedoch in bestimmten Habitaten auch in Vergesellschaftung mit *I. ricinus* vor: unter solchen Bedingungen kann ein „stillter“, nicht in Erscheinung tretender *I. hexagonus*-Pathogen-Igel-Zyklus auch *I. ricinus* erreichen, was eine Brücke zu anderen Wirbeltieren darstellt. Somit können Erreger von Igeln letztendlich auch auf andere Wirbeltiere und den Menschen übergehen (Gern et al. 1997, Dautel & Kahl 1999). In Gebieten, in denen *I. ricinus* nicht vorkommt, trägt *I. hexagonus* in besonderem Maße zur Aufrechterhaltung von Borrelien in epidemiologischen Zyklen bei (Estrada-Peña et al. 1995).

## 2.3 Zeckenübertragene Erreger

### 2.3.1 Allgemeines

#### 2.3.1.1 Übertragungsmechanismen zeckenübertragener Erreger

Im Folgenden werden die wichtigsten Transmissionswege zeckenübertragener Erreger kurz erläutert.

- **Transovariell:** Krankheitserreger werden nach Infektion der Ovarien von einer „Mutterzecke“ auf die Nachkommen übertragen, sodass die Zeckenlarven, die aus den Eiern schlüpfen, bereits infektiös sind. Insbesondere bei der Weitergabe von Viren ist dieser Übertragungsmechanismus von Bedeutung (Danielová et al. 2002).
- **Transstadial:** Für die meisten Zoonosen-Erreger, z.B. *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma* spp., FSME-Virus, erfolgt die Übertragung von Krankheitserregern transstadial, das heißt, die Krankheitserreger werden durch Larven oder Nymphen aufgenommen und bleiben nach der Häutung zum nächsten Stadium erhalten (Toutoungi & Gern 1993).
- **Co-feeding:** Unter Co-feeding versteht man die Aufnahme von Krankheitserregern durch nicht infizierte Zecken, die zeitgleich in der Nähe einer infizierten Zecke Blut saugen. Durch eine kurzzeitige lokalisierte Hautinfektion, gelangen Krankheitserreger in den „feeding pool“ der nicht-infizierten Zecke. Dieser Mechanismus ist insbesondere für die Übertragung von FSME-Viren von Bedeutung, da eine Virämie in Wirtstieren nur kurze Zeit andauert (Labuda et al. 1997). Beim Co-feeding braucht ein Wirbeltier also keine systemische Infektion auszubilden, damit die Zecke infiziert wird (Randolph et al. 1996).

### **2.3.1.2 Reservoirwirte und nicht reservoirkompetente Wirte**

Zecken können Krankheitserreger auf verschiedene Wirbeltiere übertragen. Bei den Wirtstieren unterscheidet man zwischen Reservoirwirten, die gegenüber dem Erreger tolerant sind und eine lang andauernde Bakteriämie entwickeln können, und nicht reservoirkompetenten Wirten, wie beispielsweise Rotwild, die für *Borrelia burgdorferi* s.l. eine infektionsepidemiologische Sackgasse bilden und in denen eine Weitergabe der Erreger auf Zecken unterbleibt (Tälleklint & Jaenson 1994, Perkins et al. 2006).

### **Reservoirkompetenz und Reservoirpotential**

Im Zusammenhang mit Reservoirwirten werden häufig auch die Begriffe Reservoirkompetenz, Reservoirpotential und Reservoirstatus verwendet (Gern et al. 1998). Voraussetzung für die Reservoirkompetenz ist, dass der Wirt mittels Zecken infizierbar ist und sich die Erreger in den Organen des Wirtes manifestieren und vermehren. Des Weiteren müssen Zecken, die an einem infizierten Wirtstier Blut saugen, die Erreger auch aufnehmen (positive Xenodiagnose). Das Reservoirpotential eines Wirtes ist dann besonders hoch, wenn er viele Zecken über einen längeren Zeitraum infiziert.

## **2.3.2 *Borrelia burgdorferi* s.l. (Lyme-Borreliose)**

### **2.3.2.1 Allgemeines**

Die Lyme-Borreliose ist in der nördlichen Hemisphäre nach aktuellem Kenntnisstand die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit (Poggensee et al. 2008). Die Erkrankung wird als Lyme-Borreliose bezeichnet, wobei mehrere Genospezies des *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplexes als Auslöser für eine Infektion verantwortlich sein können (siehe Kapitel 2.3.2.2).

Historische Recherchen ergaben, dass in Europa einzelne Krankheitsanzeichen der Lyme-Borreliose schon im 19. Jahrhundert von Medizinern beschrieben wurden. Das häufig am Anfang der Erkrankung auftretende „Wanderröte“ (Erythema migrans, EM) wurde bereits 1910 von Afzelius dokumentiert (Lipsker & Jaulhac 2009).

Erst etwa 100 Jahre nach der ersten klinischen Beschreibung wurde die Ätiologie dieser Erkrankung in Nordamerika aufgeklärt. Im Ort Lyme in Connecticut kam es Mitte der 1970er Jahre zu einem gehäuften Auftreten von rheumaartigen Gelenksentzündungen bei Kindern und Jugendlichen (rheumatoide juvenile Arthritis) (Steere et al. 1977). Ein Zusammenhang mit Zecken (*Ixodes scapularis*) als Vektoren wurde schnell hergestellt, da viele der Betroffenen von einem vorangegangenen Zeckenstich berichteten (Steere et al. 1977). Doch erst 1982 konnte Willy Burgdorfer ein schraubenförmiges Bakterium als Auslöser der Krankheit identifizieren (Burgdorfer et al. 1982). 1984 wurde der Erreger nach seinem Entdecker als *Borrelia (B.) burgdorferi* und die Erkrankung nach dem Entdeckungsort als Lyme-Borreliose benannt (Johnson et al. 1984).

### **2.3.2.2 Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften**

#### **Morphologie**

Bei Borrelien handelt es sich um 0,2-0,5 µm breite und 10-30 µm lange, gramnegative, schraubenförmig gewundene Bakterien (Spirochäten) (Wang et al. 1999 a). Wie andere Spirochäten besitzen sie eine äußere Zellmembran, die einen protoplasmatischen Zylinder umschließt. Dieser besteht aus einer inneren Zellmembran und dem Zytoplasma. Borrelien besitzen zur Fortbewegung 7-11 periplasmatische Endoflagellen, die an den Enden der Bakterienzelle entspringen und sich in 3-10 lockeren Windungen um die Zelle legen (Wang et

al. 1999 a, Rosa et al. 2005) (Abbildung 7).

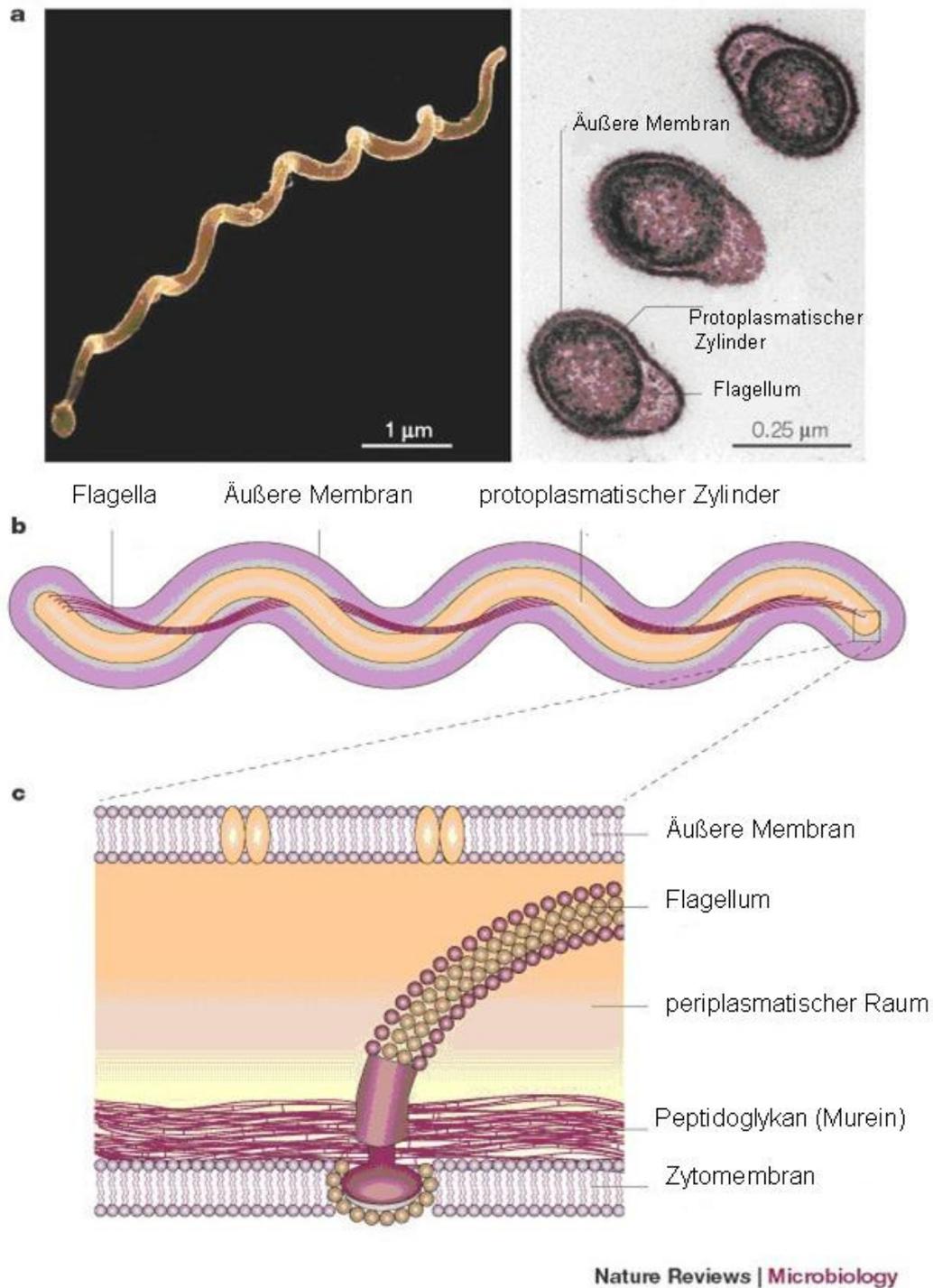


Abbildung 7: Morphologische Struktur von *Borrelia burgdorferi* s.l. Obere Reihe: a) Scanning-(links) und Transmissions-(rechts) Elektronenmikroskopaufnahme (Querschnitt durch das Bakterium). Abbildungen b) und c) schematischer Aufbau von *B. burgdorferi* s.l. (Abbildungen modifiziert nach Rosa et al. 2005).

---

## Systematik

Taxonomisch werden Arten des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes zur Ordnung der Spirochaetales gezählt und der Familie Spirochaetaceae zugeordnet (Tabelle 1). Diese Ordnung enthält 2 weitere Familien, die Brachyspiraceae und Leptospiraceae.

Für den Menschen sind vor allem die Gattungen *Treponema*, der Erreger der Syphilis (*Treponema pallidum*), *Leptospira*, der Erreger der Leptospirose (*Leptospira interrogans*), sowie die Gattung *Borrelia* von Bedeutung (Porcella & Schwan 2001).

Borrelien werden gewöhnlich in 2 Hauptgruppen aufgeteilt, einerseits die Erreger der Lyme-Borreliose (*B. burgdorferi* s.l. Komplexes) und andererseits die Erreger des Rückfallfiebers (Wang et al. 1999 a). Die meisten Rückfallfieber-Borrelien werden durch Zecken der Gattung *Ornithodoros* übertragen. Lediglich für *Borrelia recurrentis* gilt die Kleiderlaus als Hauptüberträger (Ras et al. 1996, Cutler 2010). Der Rückfallfieber-Erreger *Borrelia miyamotoi* kann auch in *Ixodes*-Zecken vorkommen (Fraenkel et al. 2002, Barbour et al. 2009). Da in der vorliegenden Arbeit nur Borrelien des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes untersucht wurden, beziehen sich die allgemein verwendeten Begriffe Borrelien, Borreliose und *Borrelia* auf diese Gruppe.

Anhand der Typisierung einer Vielzahl an Isolaten aus Zecken, Wirtstieren und Patienten kam man zu der Erkenntnis, dass die Lyme-Borreliose von mehreren *Borrelia*-Arten ausgelöst wird. Mindestens 18 verschiedene Genospezies, die als pathogen für Mensch und Tier gelten, werden nach derzeitigem Kenntnisstand weltweit unter dem *B. burgdorferi* s.l. Komplex zusammengefasst (Stanek & Reiter 2011, Tabelle 1). Der Begriff „Genospezies“ hat sich gegenüber dem Begriff „Spezies“ in der Borrelien-Forschung durchgesetzt, da die Artbeschreibung meist rein auf der genetischen Ausstattung basiert. Morphologisch sind die verschiedenen Genospezies nicht voneinander unterscheidbar.

Innerhalb einer Genospezies können mehrere Stämme („strains“) existieren. Da sich die verschiedenen Stämme in ihrer genetischen Ausstattung erheblich unterscheiden können, kann es nachträglich auch zu taxonomischen Umstrukturierungen kommen. So wurde der *Borrelia garinii* OspA-Serotyp 4 erst kürzlich von Margos et al. (2009) in *Borrelia bavariensis* umbenannt. Auch ein *Borrelia bissettii* Stamm aus Nordamerika wurde von diesen Autoren in *Borrelia kurtenbachii* umgetauft (Margos et al. 2010).

Tabelle 1: Genospezies des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes. Die Hauptverbreitungsgebiete sind jeweils mit \* gekennzeichnet. Tabelle modifiziert nach NCBI Taxonomy Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und Masuzawa (2004).

<b>Stamm:</b> Bacteria	
<b>Klasse:</b> Spirochaetes	
<b>Ordnung:</b> Spirochaetales	
<b>Familie:</b> Spirochataceae	
<b>Gattung:</b> <i>Borrelia</i>	
<b><u>B. burgdorferi</u> s.l. Gruppe</b>	
<b>Genospezies (Beschreiber)</b>	<b>Verbreitungsgebiet</b>
<i>B. afzelii</i> Canica et al., 1993	Europa*, Ost-Russland*, China
<i>B. americana</i> Rudenko et al., 2009 a	Nordamerika
<i>B. andersonii</i> Marconi et al., 1995	Nordamerika
<i>B. bavariensis</i> Margos et al., 2009	Mitteleuropa
<i>B. bissettii</i> Postic et al., 1998	Nordamerika
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto Johnson et al., 1984	Nordamerika*, Europa
<i>B. californiensis</i> Postic et al., 2007	Nordamerika
<i>B. carolinensis</i> Rudenko et al., 2009 b	Nordamerika
<i>B. garinii</i> Baranton et al., 1992	Europa*
<i>B. japonica</i> Kawabata et al., 1994	Japan
<i>B. kurtenbachii</i> Margos et al., 2010	Nordamerika
<i>B. lusitaniae</i> Le Fleche et al., 1997	Südeuropa*, Mittelmeerraum
<i>B. sinica</i> Masuzawa et al., 2001	China, Nepal
<i>B. spielmanii</i> Richter et al., 2006	Mitteleuropa
<i>B. tanukii</i> Fukunaga et al., 1996	Japan*, Nepal
<i>B. turdi</i> Fukunaga et al., 1996	Japan
<i>B. valaisiana</i> Wang et al., 1997	Europa, Japan
<i>B. yangtze</i> Chu et al., 2008	China

## Genetische Eigenschaften

Die komplette Sequenzierung des Genoms eines *B. burgdorferi* s.l. Stammes (Stamm B31) erfolgte bereits 1997 (Fraser et al. 1997). Inzwischen sind auch weitere Isolate vollständig sequenziert (Schutzer et al. 2011).

Borrelien besitzen ein lineares „Hauptchromosom“ mit einer Länge von ca. 950 kb (Fraser et al. 1997, Casjens 2000). Dadurch unterscheiden sie sich von den eng verwandten Leptospiren und Treponemen, die ein zirkuläres Chromosom besitzen. Neben dem Hauptchromosom verfügen sie über Plasmide, die linear oder zirkulär vorliegen (z.B. OspA-Plasmide) und von variabler Größe (5-220 kbp) sind (Fraser et al. 1997, Casjens 2000). Auf ihnen liegen unter anderem Gene für Oberflächenproteine, die für Pathogen-Wirt-Interaktionen essentiell sind, wie beispielsweise die sogenannten „outer surface proteins“ (Osp) OspA-F oder das VlsE-Protein („variable major protein-like sequence expressed“).

Borrelien haben viele verschiedene Strategien entwickelt, um die Immunabwehr ihres Wirtes zu umgehen (Embers et al. 2004, 2007, Coutte et al. 2009). Diese Strategien umfassen die Unterdrückung von angeborenen und erworbenen Immunantworten, den Rückzug an immunabgeschiedene Orte und die Möglichkeit der Änderung ihrer Oberflächenstruktur (Antigenvarianz) (Ohnishi et al. 2001, Embers et al. 2007, Coutte et al. 2009). Die Veränderung der Antigenstruktur beruht auf Rekombinationsereignissen. Dieser Mechanismus ist vor allem bei Mikroorganismen verbreitet, die eine lang anhaltende oder wiederholte Infektion verursachen (Coutte et al. 2009). Pathogene, die zur Antigenvarianz befähigt sind, haben einen Vorteil gegenüber ihrem „antigenically stable counterpart“, der erst sein Immunsystem auf den neuen „surface coat“ umstellen muss. Ein Protein, das einer sehr starken Rekombination unterliegt, ist das VlsE, das von Borrelien nur im Wirbeltierwirt exprimiert wird. Die ständige Veränderung der Oberfläche von Borrelien erschwert die Herstellung eines Impfstoffes (Coutte et al. 2009).

Ein Impfstoff für den Menschen wurde bereits erfolgreich im US-amerikanischen Raum vertrieben, aus ökonomischen Gründen aber wieder vom Markt genommen (Sigal 2002, Hanson & Edelman 2003). In Europa gestalten sich die Entwicklung und die Anwendung eines Impfstoffes aufgrund der Heterogenität und Vielfalt der Genospezies schwierig.

### 2.3.2.3 Verbreitung und Epidemiologie

Arten des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes sind weltweit verbreitet (Tabelle 1). Die häufigsten Genospezies auf dem europäischen Festland sind *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii*, die flächendeckend über den gesamten Kontinent verbreitet sind (Rauter & Hartung 2005, Kurtenbach et al. 2006). Die *B. garinii*-Varianten wurde bisher meist nicht nach *B. garinii* und *Borrelia bavariensis* differenziert. Die dritthäufigste, aber in Westeuropa eher seltene Genospezies, *Borrelia burgdorferi* s.s., wird hauptsächlich in Osteuropa gefunden (Hubálek & Halouzka 1997, Rauter & Hartung 2005).

Auf den britischen Inseln unterscheidet sich die Verteilung der Genospezies grundlegend von dem Verteilungsmuster auf dem Festland: dort sind *B. garinii* und *B. valaisana* die dominierenden Genospezies (Kurtenbach et al. 2006).

In Deutschland sind regional 5-35 % der Zecken (*Ixodes ricinus*) mit *B. burgdorferi* s.l. infiziert (Oehme et al. 2002, Kampen et al. 2004 b, Maetzel et al. 2005), in Endemiegebieten sogar bis zu 44 % (Maiwald et al. 1996). In der Regel ist die Borrelienprävalenz in adulten Zecken am höchsten, da sich durch die zweimalige Blutaufnahme im Larven- und Nymphenstadium die Wahrscheinlichkeit einer Infektion erhöht (Hubálek & Halouzka 1998). Die Nymphen spielen im Frühjahr und Sommer für den Menschen und andere Wirbeltiere die größte Rolle als Vektoren für Borrelien, da sie schon Gelegenheit hatten, sich als Larve an einem Reservoirwirt zu infizieren. Auch durch das Freizeitverhalten im Frühjahr und Sommer steigt das Infektionsrisiko für den Menschen (Stanek 2005, Hubálek 2009). Eine zweite Phase mit erhöhtem Infektionsrisiko ergibt sich im Herbst durch die Aktivität adulter Zecken, allerdings werden diese Stadien auf dem menschlichen Körper schnell entdeckt und rechtzeitig entfernt, bevor es zu einer Transmission von Erregern kommt. Dennoch könnte es in dieser Zeit zu einer erhöhten Transmissionsrate von Borrelien auf Säugetierwirte, an denen auch adulte Zecken saugen, kommen.

Zur Aufrechterhaltung von *B. burgdorferi* s.l.-Zyklen in einem bestimmten Habitat müssen neben vektorkompetenten Zecken auch geeignete Wirtstiere vorhanden sein (Kurtenbach et al. 1998 a, b). Reservoirwirten kommt eine Schlüsselrolle in epidemiologischen Zyklen zu, da sich saugende Zecken an ihnen infizieren können. In Waldgebieten spielen Nagetiere wie die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*), die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und die Rötelmaus (*Myodes* ehemals *Clethrionomys glareolus*) eine wichtige Rolle (Kurtenbach et al. 1998 a). Aber auch viele weitere Wirbeltiere wurden als reservoirkompetent eingestuft (Gern et al. 1998).

Etliche Untersuchungen zeigen eine Assoziation verschiedener Genospezies mit einem bevorzugten Reservoirwirt. So konnten aus Nagetieren bisher insbesondere *B. afzelii* und *B. bavariensis* (= *B. garinii* OspA-Serotyp 4) isoliert werden (Humair et al. 1999, Huegli et al. 2002, Richter et al. 2004 a, b, Kurtenbach et al. 2006).

*B. garinii* und *B. valaisiana* sind hauptsächlich auf verschiedene Vogelspezies spezialisiert (Hanincova et al. 2003, Kurtenbach 2006, Gern 2008). Man kann davon ausgehen, dass 2 hauptsächliche Transmissionszyklen bei der Verbreitung von *B. burgdorferi* s.l. eine Rolle spielen: der Kleinsäuger-Zecke- und der Vogel-Zecke-Zyklus. *B. burgdorferi* s.s. nutzt beide Zyklen und scheint nicht spezialisiert zu sein (Kurtenbach et al. 2006, Gern 2008).

Zur jährlichen Inzidenz der Lyme-Borreliose gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. Schätzungen von Lingren & Jaenson (2006) gehen von 85.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Europa aus. In einer Übersichtstabelle von Hubálek (2009) liegen die jährlichen Inzidenzen zwischen 0,01 (Türkei) und 137 (Slovenien) pro 100.000 Einwohner. Deutschland ist neben anderen europäischen Ländern wie Österreich ein Hochendemie-Gebiet. Die Lyme-Borreliose ist in Deutschland nur in den neuen Bundesländern, seit Juni/Juli 2011 auch in Rheinland-Pfalz und dem Saarland, eine meldepflichtige Erkrankung. Die Daten zur Inzidenz basieren daher hauptsächlich auf Schätzungen und können regional stark variieren. Krause & Fingerle (2009) gehen von einer jährlichen Inzidenz von 25 bis über 100 pro 100.000 Einwohnern aus, sodass mit durchschnittlich 20.000 bis über 80.000 Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr zu rechnen ist.

#### **2.3.2.4 *Borrelia burgdorferi* s.l. als Krankheitserreger**

In Europa wird die Lyme-Borreliose beim Menschen vor allem von *B. afzelii*, *B. garinii* (inklusive *B. bavariensis*) und *B. burgdorferi* s.s. verursacht (Baranton & De Martino 2009, Strle & Stanek 2009). Jedoch wird teilweise auch DNA von *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* und *B. bissettii* in Patientenproben nachgewiesen (Baranton & De Martino 2009). Während die Humanpathogenität bei *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* zweifelsfrei abgesichert ist, ist sie bei den anderen Genospezies noch nicht eindeutig geklärt (Baranton & De Martino 2009).

Die Lyme-Borreliose ist gekennzeichnet durch ein Spektrum unterschiedlicher klinischer Manifestationen und Krankheitsverläufe (Strle & Stanek 2009). Die Infektion verläuft in mehr als 25 % der Fälle klinisch unauffällig (Krause & Fingerle 2009). Ein frühes Anzeichen der

Infektion stellt das Erythema migrans (EM) dar, eine lokale, meist kreisförmige Hautrötung, die bei 60-90 % der Betroffenen 1 bis 3 Wochen nach dem Zeckenstich auftritt.

Die humanpathogenen Genospezies scheinen bevorzugt bestimmte Organsysteme, im Sinne eines Organtropismus, zu befallen: so wird *B. afzelii* mit Hauterscheinungen (vor allem mit EM aber auch mit der chronischen Hautläsion Acrodermatitis chronica atrophicans, ACA) assoziiert (Balmelli & Piffaretti 1995, Strle & Stanek 2009). *B. spielmanii* konnte bisher ebenfalls vorrangig aus Hautbiopsien gewonnen werden (Wang et al. 1999 b, Földvári et al. 2005, Maraspin et al. 2006). Neurologischen Funktionsstörungen treten häufig nach Infektion mit *B. garinii*-Stämmen bzw. *B. bavariensis* auf, *B. burgdorferi* s.s. wird häufig in Verbindung mit der Lyme-Arthritis genannt (Strle & Stanek 2009). Abgesehen vom Erythema migrans, welches einer späten Manifestation vorausgehen kann, aber nicht zwingend muss, zeigen die meisten Patienten lediglich Symptome an einem Organsystem (Strle & Stanek 2009). Die unterschiedlichen Organmanifestationen führt man auf die Heterogenität des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes zurück (Baranton & de Martino 2009).

Die Lyme-Borreliose wird oft in 3 Stadien eingeteilt, oder in Früh- und Spätstadien untergliedert, wobei nicht alle dieser Stadien durchlaufen werden müssen:

#### **Borreliose-Stadium I** (wenige Tage bis Wochen nach dem Zeckenstich)

In weiten Teilen Europas ist das Erythema migrans das häufigste zu beobachtende Leitsymptom der Erkrankung. Es wird in ca. 80-90 % der gesicherten Borreliosefälle beobachtet (Huppertz et al. 1999, Strle & Stanek 2009). Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass dieses Erscheinungsbild der Borreliose meist durch *B. afzelii* verursacht wird, eine der häufigsten Genospezies in Mitteleuropa. Begleitend zum Erythema migrans treten häufig unspezifische Symptome wie Fieber, Kopfschmerzen und Myalgien auf. Durch eine rechtzeitige Diagnose und die frühe Therapie des Erythema migrans können Spätfolgen der Lyme-Borreliose, wie beispielsweise eine Neuroborreliose oder eine Lyme-Arthritis meist verhindert werden (Hansmann 2009).

**Borreliose-Stadium II** (1 bis 16 Wochen nach dem Zeckenstich)

Bleibt die Borrelien-Infektion unbehandelt, kann es zu Spätfolgen kommen. Das Borreliose-Stadium II tritt Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich auf. Neben der Haut betrifft die Infektion nun auch weitere Organe. Ist das Nervensystem beteiligt, spricht man auch von einer Neuroborreliose. Die Erkrankung äußert sich in Form einer Hirnhaut- und Nervenwurzelentzündung (sog. Meningopolyneuritis oder Bannwarth-Syndrom). In den meisten Fällen ist nur ein einzelner Nerv entzündet, zum Beispiel der Gesichtsnerv. Ein typisches Symptom für eine solche Lähmung (Fazialisparese) ist ein einseitig herabhängender Mundwinkel. Darüber hinaus können Borrelien das Herz befallen. Dies führt zu einer Herzmuskel- und Herzbeutelentzündung und löst typische Herzrhythmusstörungen aus (Krause & Fingerle 2009).

**Borreliose-Stadium III** (Monate bis Jahre nach dem Zeckenstich)

Das charakteristische Merkmal dieses Spätstadiums ist die Lyme-Arthritis. Bei der Lyme-Arthritis handelt es sich um eine schubweise oder chronisch verlaufende Entzündung eines oder mehrerer Gelenke (Mono- oder Oligoarthritis). Besonders häufig betrifft dies die Kniegelenke. Schmerzen der Sehnen und Muskeln können vorkommen, lassen sich aber oft nur schwer von anderen Erkrankungen unterscheiden. Auch die Nerven können Schaden nehmen. Selten verläuft das Stadium III der Lyme-Borreliose so schwer, dass Teile des Körpers gelähmt sind (Paresen).

**Lyme-Borreliose beim Tier**

Auch domestizierte Tiere wie beispielsweise Hunde, Katzen und Pferde können prinzipiell an der Lyme-Borreliose erkranken. Bei ihnen kann die Krankheit ähnlich wie beim Menschen in Erscheinung treten (Gall & Pfister 2006, Krupka & Straubinger 2010). Es wird davon ausgegangen, dass sich bei Tieren, insbesondere bei Wildtieren, durch die natürliche Zecken- und Erregerexposition im Laufe der Evolution ein ausgewogenes Wirt-Parasit-Verhältnis ausgebildet hat, und Infektionen meist subklinisch verlaufen (Scotarczak 2002). Serologische Studien weisen auf einen häufigen Kontakt von Tieren mit Borrelien hin (Stöbel et al. 2002, Juricová & Hubálek 2009, Kybicová et al. 2009). Allerdings sind der Verlauf der Infektion sowie deren klinische Erscheinungsformen oder die Persistenz des Erregers, insbesondere in Wildtieren, weitestgehend ungeklärt (Scotarczak 2002).

### 2.3.2.5 Diagnostik

#### Serodiagnostik

In der Humanmedizin steht der Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* s.l. im Serum und Liquor an erster Stelle (Wilske et al. 2007).

Eine nachweisliche Borrelieninfektion beginnt in der Regel mit dem Anstieg von IgM-Antikörpern nach etwa 3 und von IgG-Antikörpern nach etwa 6 Wochen im Blut (Abbildung 8) (Wilske et al. 2007). Im Stadium II sind IgG-Antikörper im Serum in 70-90 % der Fälle nachweisbar. Im Stadium III sind typischerweise (90-100 %) sehr hohe IgG-Titer vorhanden, während der IgM-Spiegel diagnostisch praktisch keine Rolle mehr spielt (Wilske et al. 2007).

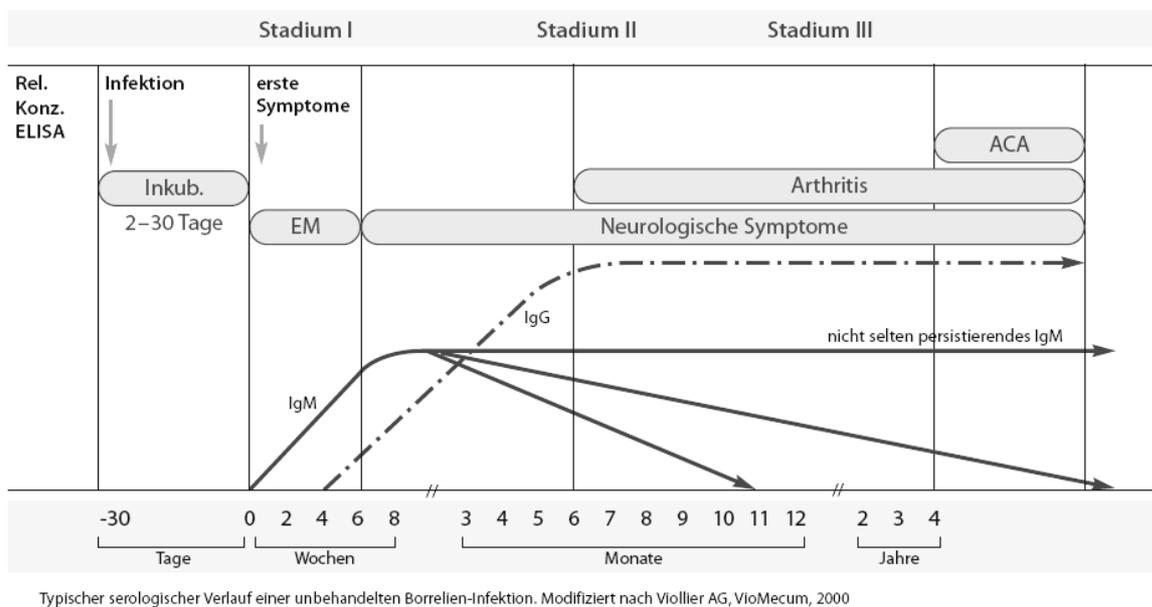


Abbildung 8: Schematischer Verlauf einer Borrelieninfektion; (Quelle: „Zecken-übertragbare Erkrankungen“ GanzImmun, Fachbroschüre 0031).

Für den serologischen Nachweis der Lyme-Borreliose wird eine 2-Stufen-Diagnostik empfohlen (Wilske et al. 2000, 2007). Als Screening-Verfahren eignen sich der „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) oder der Immun-Fluoreszenz-Antikörper-Test (IFAT). Fällt dieser erste Test positiv aus, wird vielfach der Immunblot als Bestätigungstest eingesetzt (Wilske et al. 2007).

Zu beachten ist, dass bei der Verwendung von Borrelien-Lysat als Antigen die Gefahr besteht, dass es durch Kreuzreaktionen mit eng verwandten Spirochäten (Treponemen, Leptospiren)

und einigen viralen Infektionen (z.B. Eppstein-Barr Virus) zu falsch positiven Reaktionen kommt (Horst 1997). Seit Kurzem existieren Tests der sogenannten „dritten Generation“, in denen hochspezifische Antigene in rekombinanter Form verwendet werden, wodurch die Diagnostik erheblich verbessert werden konnte (Göttner et al. 2005, Wilske et al. 2007).

Allein auf serologischen Befunden kann der Nachweis einer Lyme-Borreliose allerdings nicht basieren. So schließt eine negative Serologie, insbesondere im Anfangsstadium, eine Lyme-Borreliose nicht aus. Andererseits können auch hohe IgG-Titer nach einer früheren, subklinisch verlaufenden Infektion, über Jahre hinweg bestehen bleiben.

### **Direkter Nachweis**

Ein direkter Nachweis des Erregers erfolgt entweder durch Anzucht in speziellen Kulturmedien oder durch die PCR bestimmter Genabschnitte. Die Anzucht von Borrelien ist sehr aufwendig, zeitintensiv und teuer. Die PCR hat sich daher zum Routinenachweis in der Diagnostik entwickelt, da sie sowohl die Detektion von Borrelien in epidemiologischen als auch in klinischen Studien zuverlässig erlaubt. In den letzten Jahren wurden verschiedene PCR-Protokolle entwickelt, die auch die Differenzierung verschiedener Genospezies ermöglichen (Baranton & De Martino 2009). Verwendete Zielsequenzen sind z.B. das OspA-Gen (Rauter et al. 2002, Michel et al. 2003), das OspC-Gen (Wang et al. 1999 a) oder die „spacer region“ zwischen dem 5S und 23S rRNA-Gen (Rijpkema et al. 1995).

### **2.3.3 *Anaplasma phagocytophilum* (Anaplasmosen)**

#### **2.3.3.1 Allgemeines**

Die humane granulozytäre Anaplasmosen (HGA), ursprünglich auch als humane granulozytäre Ehrlichiose (HGE) bekannt, wird von *Anaplasma phagocytophilum* hervorgerufen (Dumler et al. 2005). *A. phagocytophilum* befällt insbesondere die Granulozyten, wo die Vermehrung in zytoplasmatischen Vakuolen findet. Andere Arten wie beispielsweise *Anaplasma bovis* sind in den Monozyten lokalisiert oder befallen Thrombozyten (*Anaplasma platys*) (Walker & Dumler 1996, Goethert & Telford 2003). Der Name der Erkrankung wird daher oft in Verbindung mit der Affinität des Erregers zum jeweiligen Zelltypus der zellulären Abwehr genannt.

In der Tiermedizin ist die granulozytäre Anaplasmosen schon seit langer Zeit bekannt. In Europa wurden Erreger, die bei Schafen, Ziegen und Rindern die Granulozyten befallen, erstmalig 1932 beschrieben und *Ehrlichia phagocytophila* genannt (Woldehiwet 2010). Aufgrund von Sequenzhomologien der 16 rDNA kam es zum Zusammenschluss von *E. equi*, *E. phagocytophila* und des Erregers der HGE zu *A. phagocytophilum* (Dumler et al. 2001). Uilenberg et al. (2004) kritisierten jedoch die unzureichende Berücksichtigung anderer Genorte und die fehlende Charakterisierung von phänotypischen Eigenschaften.

*A. phagocytophilum* hat ein sehr breites Wirtsspektrum; je nach Tierart stellt sie den Erreger der caninen, felines, equinen Anaplasmosen, des Zeckenfiebers der Wiederkäuer und der humanen granulozytären Anaplasmosen dar (Rymaszewska & Grenda 2008, Woldehiwet 2010). Aber auch Wildtiere, darunter Nagetiere und Rehwild, sind für eine Infektion empfänglich und können zur Verbreitung von unterschiedlichen *A. phagocytophilum*-Varianten beitragen.

#### **2.3.3.2 Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften**

*Anaplasma phagocytophilum* ist ein kleines (0,5-1,5 µm), pleomorphes, gramnegatives, obligat intrazellulär lebendes Bakterium (Dumler et al. 2001). Es befällt vor allem neutrophile Granulozyten von Säugetieren, in denen es zur Ausbildung der charakteristischen Morulae-Form kommt (Abbildung 9) (Dumler et al. 2001, Carrade et al. 2009).

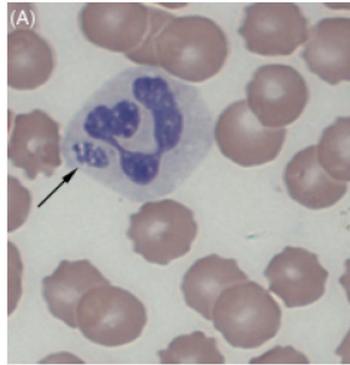


Abbildung 9: Neutrophiler Granulozyt eines Hundes infiziert mit *Anaplasma phagocytophilum* mit typischer Morulae-Form. Der Pfeil deutet auf den Erreger. Wrights Färbung; 100x Vergrößerung. Abbildung aus Carrade et al. (2009).

Taxonomisch gehört *A. phagocytophilum* zur Familie der Anaplasmataceae und wird in die Ordnung der Rickettsiales eingruppiert. Die bisher bekannten Gattungen der Rickettsiales zeigen eine komplexe Lebensweise und Epidemiologie, wodurch die systematische Eingruppierung erschwert wird (Walker & Dumler 1996).

Bei den von Schildzecken übertragenen Gattungen nehmen vor allem *Anaplasma*- und *Ehrlichia*-Arten eine wichtige human- und veterinärmedizinische Stellung ein (Tabelle 2).

6 Arten besitzen aktuell humanpathogenes Potential (Dumler et al. 2001, Welinder-Olsson et al. 2010):

- *Neorickettsia sennetsu*: verursacht das „Sennetsu-Fieber“ (Zellafinität zu Monozyten)
- *Ehrlichia chaffeensis*: verursacht die humane monozytäre Ehrlichiose (HME)
- *Ehrlichia canis*: verursacht die humane monozytäre Ehrlichiose (HME)
- *Ehrlichia ewingii*: verursacht die humane granulozytäre Ehrlichiose (HGE)
- *Anaplasma phagocytophilum*: verursacht die humane granulozytäre Anaplasrose (HGA)
- Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*: befällt sowohl Monozyten als auch Granulozyten

Tabelle 2: Systematik der Anaplasmataceae basierend auf Dumler et al. (2001) und der NCBI Taxonomy Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Stand: Mai 2010.

<b>Stamm:</b> Bacteria		
<b>Unterstamm:</b> Proteobacteria		
<b>Klasse:</b> Alphaproteobacteria		
<b>Ordnung:</b> Rickettsiales		
Familie	Gattung	Art
Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i>	<i>bovis</i> <i>centrale</i> <i>marginale</i> <i>ovis</i> <i>platys</i> <u><i>phagocytophilum</i>-Gruppe</u>
	<i>Aegyptianella</i>	<i>pullorum</i>
	(Candidatus) <i>Neoehrlichia</i>	<i>lotoris</i> (candidatus) <i>mikurensis</i>
	<i>Ehrlichia</i>	<u><i>canis</i>-Gruppe</u> <i>chaffeensis</i> <i>ewingii</i> <i>muris</i> <i>ovina</i> <i>ruminantum</i> (candidatus) <i>shimanesis</i>
	<i>Neorickettsia</i>	<i>helminthoeca</i> <i>risticii</i> <i>sennetsu</i>

### Genetische Eigenschaften

*A. phagocytophilum* besitzt ein einzelnes, zirkuläres Chromosom mit mehreren sich wiederholenden Sequenzen im Genom (Dunning Hotopp et al. 2006).

Die genetisch unterschiedlichen Stämme („strains“), die bisher aus Zecken und Säugetieren extrahiert werden konnten, zeigen eine starke Heterogenität hinsichtlich ihrer Vektoren, Reservoirwirte, Gewebetropismus im Wirt, DNA-Sequenzen, Pathogenität und geografischer Verbreitung (Massung et al. 2002, Von Loewenich et al. 2003, De la Fuente et al. 2005).

Die bisherigen Untersuchungen deuten auf eine Wirtsspezifität einzelner Stämme hin; weshalb manche Varianten pathogener sind als andere, ist noch weitgehend unverstanden (Carrade et al. 2009).

### 2.3.3.3 Verbreitung und Epidemiologie

Die geografische Verbreitung und Saisonalität der Erkrankung bei Mensch und Tier stimmt mit der Verbreitung und der Saisonalität der jeweiligen Vektoren überein.

Veröffentlichungen über *Anaplasma phagocytophilum* in Zecken aus Europa (Blanco & Oteo 2002, Bown et al. 2003, Sreter et al. 2004, De la Fuente et al. 2005), Amerika (Levin et al. 2002, Massung & Slater 2003), Asien (Cao et al. 2006, Zhan et al. 2008) und Afrika (Inokuma et al. 2005) deuten auf eine weltweite Verbreitung hin.

Überträger von *A. phagocytophilum* sind vorrangig Schildzecken der Gattung *Ixodes*. In den USA sind dies *Ixodes scapularis* und *Ixodes pacificus*, in Asien vorrangig *Ixodes persulcatus*. In Europa wird *Ixodes ricinus* als Hauptvektor angesehen (Foley et al. 2008).

In der Natur wird *A. phagocytophilum* durch vielgestaltige Zecken-Vertebraten-Kreisläufe verbreitet. Das Wirtsspektrum von *A. phagocytophilum* umfasst sowohl zahlreiche Haus-, Nutz- und Wildtierarten als auch den Menschen. Bei den Haus- und Nutztieren können Pferde, Hunde, Katzen, Schafe, Rinder, Bisons und Lamas betroffen sein (Granquist et al. 2010). Allerdings werden viele Wirte wie Menschen und Hunde als „accidental hosts“ angesehen, da sie nur eine kurz andauernde Bakteriämie ( $\leq 28$  Tage) entwickeln und somit nur sekundär an der Verbreitung von *A. phagocytophilum* beteiligt sind (Carrade et al. 2009).

In Abhängigkeit von der geografischen Lage kann eine Vielfalt an kleinen und mittelgroßen Säugetieren als mögliches Reservoir fungieren (Nieto & Foley 2008, Carrade et al. 2009, Ismail et al. 2010, Nieto et al. 2009, 2010). In Europa sind dies vor allem Rotwild (*Cervus elaphus*), Rehe (*Capreolus capreolus*), Gemsen (*Rupicapra rupicapra*), Rotfüchse (*Vulpes vulpes*) und kleine Nagetiere insbesondere aus der Familie der Wühler (Cricetidae) z.B. *Myodes glareolus* (Alberdi et al. 2000, Liz et al. 2002, Petrovec et al. 2002, Bown et al. 2003, Hartelt et al. 2004, De la Fuente et al. 2008). Aber auch Weidetiere wie beispielsweise Schafe, können eine zyklisch wiederkehrende Bakteriämie entwickeln, die mehrere Monate andauern kann (Granquist et al. 2008, 2010, Ladbury et al. 2008).

Im Zuge des fortschreitenden Screenings von Wildtieren auf *A. phagocytophilum* werden zunehmend neue Wirte entdeckt, wie z.B. der Europäische Braunbär (*Ursus arctos*), aber auch Reptilien (Nieto et al. 2009, Víchová et al. 2010).

Im Jahr 1994 wurde erstmalig der Fall einer humanen Anaplasrose in den USA beschrieben (Chen et al. 1994). Dort tritt die Krankheit mittlerweile als zweithäufigste durch Zecken übertragene Krankheit auf und stellt ein zunehmendes Problem in der Humanmedizin dar (Bakken & Dumler 2006). Obwohl in Deutschland bislang noch kein gesicherter Fall einer akuten humanen *A. phagocytophilum* Infektion dokumentiert ist, weisen Untersuchungsergebnisse aus serologischen und epidemiologischen Studien auf eine flächendeckende Verbreitung hin (Oehme et al. 2002, Von Loewenich et al. 2003, Barutzki et al. 2006, Jensen et al. 2007, Krupka et al. 2007).

#### **2.3.3.4 *Anaplasma phagocytophilum* als Krankheitserreger**

*Anaplasma phagocytophilum* vermehrt sich intrazellulär in den Granulozyten. Zusätzlich wurde auch eine Infektion der endothelialen Zellen nachgewiesen (Herron et al. 2005). Die Erkrankung kann inapparent („nicht in Erscheinung tretend“) oder asymptomatisch („ohne Symptome“) verlaufen und durch eine Serokonversion gekennzeichnet sein.

Anzeichen der Erkrankung können unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Fieber, Myalgien, starke Kopfschmerzen, Müdigkeit und Schüttelfrost aber auch Störungen des gastro-intestinalen Systems sowie des zentralen Nervensystems sein (Bakken & Dumler 2006, Bitam & Raoult 2009, Ismail et al. 2010). Die Infektion verläuft in den meisten Fällen mild und selbst-limitierend. Auch ohne eine Antibiotika-Behandlung dauert die akute Infektion meist nicht länger als 2 Monate (Bakken & Dumler 2006). Todesfälle, die oft durch Komplikationen wie Sepsis oder Sekundärinfektionen hervorgerufen werden, treten nur in  $\leq 1\%$  der klinisch auffälligen Patienten auf (Carlyon & Fikrig 2003, Bakken & Dumler 2006). Schwere Krankheitsverläufe scheinen gehäuft bei älteren Menschen oder bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem aufzutreten (Carrade et al. 2009).

Mithilfe von serologischen Tests, aber auch durch den direkten Nachweis des Erregers mittels PCR oder durch mikroskopische Techniken (Giemsa Färbung) kann eine Diagnose gestellt werden (Carrade et al. 2009).

### 2.3.4 *Rickettsia* spp. (Rickettsiosen)

Rickettsiosen sind Erkrankungen, die durch Bakterien der Gattung *Rickettsia* (Rickettsiaceae) hervorgerufen werden. Zur Gattung *Rickettsia* gehören einige der ältesten bekannten Infektionserreger wie *Rickettsia prowazekii*, der Erreger des epidemischen Fleckfiebers (engl. typhus) (Raoult & Roux 1997).

Mit dem Fortschritt der Technik und der molekularbiologischen Untersuchung werden seit 30 Jahren kontinuierlich neue *Rickettsia*-Arten entdeckt (Bitam & Raoult 2009). Allein von 1984 bis 2005 wurden 11 neue humanpathogene Arten beschrieben, und weitere 15 sind in der NCBI Taxonomy Datenbank als „Candidatus“ gelistet (Stand: April 2010). Allerdings existieren zu den meisten Vertretern bisher nur wenige epidemiologische Daten und nur lückenhafte Untersuchungen über den Lebenszyklus, mögliche Vektoren und deren Reservoirwirte (Sprong et al. 2009).

#### 2.3.4.1 Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften

Rickettsien sind sehr kleine, gramnegative Bakterien, die keine Sporen ausbilden. Meist sind sie von runder bis ovaler Gestalt mit einem Durchmesser von 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 0,8-2  $\mu\text{m}$  (La Scola & Raoult 1997). Sie leben obligat intrazellulär und befallen die Endothelzellen kleiner Blutgefäße.

Rickettsiaceae und Anaplasmataceae sind genetisch verwandt und gehören zur Ordnung der Rickettsiales innerhalb der Klasse der  $\alpha$ -Proteobakterien (Bogdan 2009).

Ursprünglich wurden Rickettsien in 3 Gruppen unterteilt, was auf phänotypischen Erscheinungsbildern und klinischen Kriterien basierte: die epidemische Fleckfieber-Gruppe („typhus group“, TG), die durch Zecken übertragene Zeckenstichfieber-Gruppe („spotted fever group“, SFG) und die Tsutsugamushi-Gruppe („scrub typhus group“, STG) (Roux & Raoult 2000, Blanco & Oteo 2006, Bitam & Raoult 2009). Jedoch gestaltet sich diese traditionelle Einteilung aufgrund der Vielfalt hinsichtlich der intrazellulären Erscheinungsformen, verschiedener Vektoren und Wirte, der Lebensweise, der genetischen Ausstattung etc. nicht ganz einfach (Raoult & Roux 1997, Sekeyova et al. 2001). Neuerdings wird die Gattung *Rickettsia* in die große, stark heterogene Zeckenstichfieber-Gruppe, die kleine Fleckfieber-Gruppe, sowie eine Übergangsguppe untergliedert (Tabelle 3). Das Krankheitsbild beider Hauptgruppen ist klinisch nicht eindeutig voneinander unterscheidbar;

allerdings können die Gruppen anhand des Oberflächenproteins OmpA (fehlend bei Vertretern der Fleckfieber-Gruppe) und ihrer Vektoren differenziert werden (Tabelle 3) (Pérez-Osorio et al. 2008). Die einstige Tsutsugamushi-Gruppe wurde in die eigene Gattung *Orientia* umgewandelt (Roux & Raoult 2000).

Tabelle 3: Übersicht der humanpathogenen *Rickettsia*-Arten in Europa. Tabelle modifiziert nach NCBI Taxonomy Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Dobler & Wölfel (2009) und Bitam & Raoult (2009).

<i>Rickettsia</i> -Art	Erkrankung	Vektoren	Verbreitung
<b>Fleckfieber-Gruppe</b>			
<i>R. prowazekii</i>	Klassisches Fleckfieber, Klassischer Typhus exanthematicus, Brill-Zinsser-Krankheit	Kleiderläuse	weltweit
<i>R. typhi</i>	Murines Fleckfieber (endemischer Typhus)	Flöhe	weltweit
<b>Zeckenstichfieber-Gruppe</b>			
<i>R. conorii</i>	Mittelmeerfleckfieber („mediterranean spotted fever“, MSF), Boutonneuse-Fieber	<i>Rhipicephalus</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp.	Mittelmeerländer, Afrika, Südwestasien, Indien
<i>R. helvetica</i>	Aneruptives Zeckenstichfieber	<i>Ixodes</i> spp.	Eurasien
<i>R. massiliae</i>	Zeckenstichfieber	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Europa
<i>R. monacensis</i>	Zeckenstichfieber	<i>Ixodes</i> spp.	Europa
<i>R. raoultii</i>	Zeckenstich-Lymphadenitis (“tick-borne lymphadenopathy“, TIBOLA)	<i>Dermacentor</i> spp.	Europa, Russland
<i>R. rickettsii</i>	Rocky Mountain-Zeckenstichfieber (“Rocky Mountain spotted fever“, RMSF)	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp., <i>Ixodes</i> spp.	Westliche Hemisphere
<i>R. sibirica</i> <i>mongolitimonae</i>	Zeckenstich-Lymphangitis (“lymphangitis associated rickettsiosis“, LAR)	<i>Hyalomma</i> spp., <i>Rhipicephalus</i>	China, Israel, Frankreich, Spanien, Portugal, Algerien, Niger
<i>R. slovaca</i>	Zeckenstich-Lymphadenitis (TIBOLA)	<i>Dermacentor</i> spp.	Eurasien
<b>Übergangsgruppe</b>			
<i>R. akari</i>	Rickettsien-Pocken	Milben	weltweit
<i>R. felis</i>	Flohleckfieber	Flöhe	weltweit

#### 2.3.4.2 Verbreitung und Epidemiologie

*Rickettsia*-Arten sind weltweit verbreitet. Dabei hängt das Vorkommen im Wesentlichen von der Verbreitung der Vektoren ab. Rickettsien sind als obligat intrazellulär lebende Bakterien in Arthropoden zu finden und werden durch Speichel oder Kot sowie Blut oder Aerosol auf den Vertebraten übertragen. Neben Zecken gelten Läuse, Flöhe und Milben als Überträger und meist auch als wichtigstes Erregerreservoir, da in ihnen eine starke Vermehrung stattfindet (Dobler & Wölfel 2009).

In Deutschland kommen mindestens 6 *Rickettsia*-Arten indigen vor: *Rickettsia helvetica*, *R. felis*, *R. monacensis*, *R. massiliae*, *R. raoultii* und *R. slovaca* (Dobler & Wölfel 2009). *R. felis* wird vorrangig durch Flöhe übertragen. Während *R. slovaca* und *R. raoultii* primär durch *Dermacentor*-Zecken verbreitet werden (Pluta et al. 2009, 2010) sind *R. helvetica*, *R. monacensis* und *R. massiliae* hauptsächlich in *Ixodes ricinus* detektierbar (Simser et al. 2002). Inwieweit Wirbeltiere in die Epidemiologie von Rickettsien involviert sind und zur Aufrechterhaltung von Naturherden beitragen, ist im Vergleich zu Arthropoden nur lückenhaft untersucht. Bestimmte Wildtiere gelten als Reservoirwirte. Dazu zählen Nagetiere, Hasenartige, Hunde und Hirsche. Während serologische Studien zeigen, dass Wildtiere oft in Kontakt mit Rickettsien kommen, gibt es über den direkten Nachweis von Rickettsien in Wirtsgewebe bisher nur sehr wenig Information.

#### 2.3.4.3 Rickettsien als Krankheitserreger

Bei mehr als 20 *Rickettsia*-Arten wurde bisher ein humanpathogenes Potential nachgewiesen (Parola et al. 2005). Je nach Rickettsienart können die Symptome und der Verlauf der Erkrankung von milden, asymptomatischen bis zu lebensbedrohlichen Zuständen reichen (Parola et al. 2005, Bitam & Raoult 2009).

In Europa werden Rickettsien vor allem im südeuropäischen Raum als zunehmendes Gesundheitsproblem in der menschlichen Bevölkerung angesehen. In den Jahren 1998-2002 wurden allein in Italien 4604 klinische Fälle des Mittelmeerfleckfiebers beschrieben, von denen 33 tödlich verliefen. Verursacher war dabei hauptsächlich *Rickettsia conorii*, der Auslöser des Mittelmeerfleckfiebers (Ciceroni et al. 2006). Andere Arten wie *Rickettsia helvetica* scheinen eine mildere Erkrankung beim Menschen hervorzurufen (Ciceroni et al. 2006, Bitam & Raoult 2009).

Die Krankheitserscheinungen der unterschiedlichen Rickettsiosen sind sich ähnlich. Die

Bakterien dringen in die Wände der Blutgefäße ein. Dadurch kommt es zu charakteristischen punktförmigen Einblutungen (Petechien) aus den feinen Kapillaren in die Haut oder die Schleimhäute (Kimmig et al. 2010).

#### **2.3.4.4 *Rickettsia helvetica***

Insbesondere in die Epidemiologie von *Rickettsia helvetica* scheint *Ixodes ricinus* über den ganzen europäischen Kontinent stark involviert zu sein (Hartelt et al. 2008). Berichte über den Nachweis von *R. helvetica* in *I. ricinus* häufen sich in europäischen Ländern, von Spanien und Italien (Sanogo et al. 2003, Fernandez-Soto et al. 2004) bis hin zum Nordwesten Russlands (Movila et al. 2011), was für eine flächendeckende Verbreitung spricht.

Über die Beteiligung von anderen Zeckenarten in der Epidemiologie von *R. helvetica* sind bisher nur unzureichende Informationen vorhanden. Hornok et al. (2010) stellten fest, dass nicht *I. ricinus*, sondern *Haemaphysalis inermis* das größte Vektorpotential für *R. helvetica* in ihrem Untersuchungsgebiet in Ungarn besitzt. In Kroatien konnte in *Dermacentor reticulatus* zu 10 % *R. helvetica* nachgewiesen werden (Dobec et al. 2009).

Auch über mögliche Reservoirwirte ist der derzeitige Wissensstand noch sehr lückenhaft. Epidemiologische Studien belegen, dass Zugvögel infizierte Zecken über weite Strecken, auch auf Inseln, verbreiten können und Reservoir für *R. helvetica* darstellen (Elfving et al. 2010, Franke et al. 2010, Movila et al. 2010). Aber auch andere Wirbeltiere, darunter Eidechsen, besitzen Reservoirkompetenz (Tijssse-Klasen et al. 2011). Sprong et al. (2009) wiesen *R. helvetica* im Blut von Mäusen, Rehwild und Wildschweinen nach.

Obwohl der Erreger schon 1979 in der Schweiz entdeckt wurde (Burgdorfer et al. 1979) und der ursprüngliche Name „Swiss agent“ durch Beati et al. (1993) in den Artnamen *R. helvetica* umgewandelt wurde, konnte erst vor Kurzem das bereits seit Langem vermutete humanpathogene Potential durch direkte Isolation des Erregers bei einem Patienten mit klinischen Anzeichen einer Meningitis bestätigt werden (Nilsson et al. 2010). Jedoch gibt es bisher nur einzelne Beschreibungen von humanen Infektionen mit unterschiedlichen Symptomen, weshalb momentan kein einheitliches Krankheitsbild vorliegt (Fournier et al. 2000, Nilsson 2009).

Inwieweit die Erkrankung bei Tieren in Erscheinung tritt, ist unbekannt (Boretti et al. 2009).

### 2.3.5 FSME-Viren (Frühsommer-Meningo-Enzephalitis)

FSME-Viren sind die Erreger der von Zecken übertragenen Enzephalitis (engl. TBE; tick-borne encephalitis), in Deutschland unter dem Namen „FSME“ (Frühsommer-Meningo-Enzephalitis) bekannt; Unter den von Arthropoden übertragenen viralen Erkrankungen wird sie als die bedeutendste Arbovirose („arthropod-borne“=Arbo) in Mitteleuropa angesehen (Haglund & Günther 2003, Heinz & Kunz 2004, Mansfield et al. 2009).

#### 2.3.5.1 Morphologie, Systematik und genetische Eigenschaften

Beim FSME-Virus handelt es sich um ein RNA-Virus, das zur Familie der Flaviviridae gehört (Mansfield et al. 2009). Flaviviren sind kleine (Durchmesser 40-60 nm), runde Partikel, die von einer Virushülle umgeben sind und aus nur 3 Strukturproteinen bestehen (Kofler et al. 2002, Mansfield et al. 2009). Das innen liegende ikosaedrische Nukleokapsid wird aus viralen C-Proteinen (11 kDa) gebildet und umschließt das einzelsträngige RNA-Molekül (ca. 11 kb) (Kofler et al. 2002, Mansfield et al. 2009). Dieses Kapsid wird wiederum von einer Hüllmembran umschlossen, auf deren äußerer Oberfläche sich kleine M-Proteine (8 kDa) und große E-Proteine (54 kDa) befinden (Kofler et al. 2002) (Abbildung 9). E-Proteine scheinen entscheidend für die Virulenz zu sein, da sie maßgeblich am Eindringen in die Wirtszellen beteiligt sind (Mansfield et al. 2009).

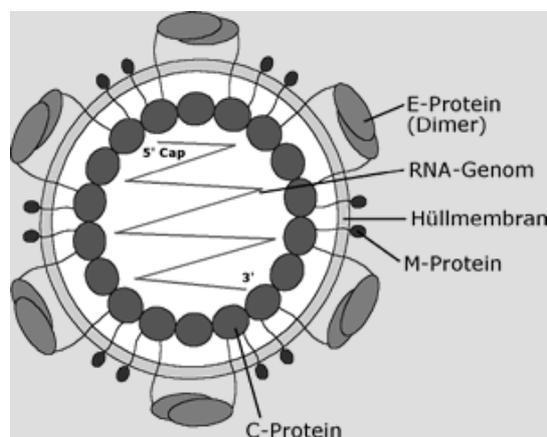


Abbildung 10: Schematischer Aufbau des FSME-Virus. Quelle: [http://www.infektionsbiologie.ch/parasitologie/seiten/modellparasiten/ixodes/FSME-\\_virus.gif](http://www.infektionsbiologie.ch/parasitologie/seiten/modellparasiten/ixodes/FSME-_virus.gif), Stand: 20.02.2011.

### 2.3.5.2 Verbreitung und Epidemiologie

FSME-Viren kommen endemisch in Mittel- und Osteuropa, Russland bis hin nach Sibirien und Japan vor (Abbildung 11) (Lindquist & Vapalathi 2008, Mansfield et al. 2009). Sie werden anhand der geografischen Verbreitung und Sequenzanalysen in 3 Subtypen eingeteilt, die genetisch eng miteinander verwandt sind: den Westeuropäischen, den Sibirischen und den Fernöstlichen Subtyp (Heinz & Kunz 2004, Jääskeläinen et al. 2006, Lindquist & Vapalathi 2008, Mansfield et al. 2009). Innerhalb der Subtypen lassen sich molekularbiologisch verschiedene Stämme unterscheiden.

Das Verbreitungsgebiet von FSME-Viren deckt sich mit der Verbreitung der Vektoren (Abbildung 11). In Westeuropa gilt *Ixodes ricinus* als Hauptüberträger des Europäischen Subtyps, für die anderen beiden Subtypen ist es die Zeckenart *Ixodes persulcatus* (Jääskeläinen et al. 2006, Lindquist & Vapalathi 2008).

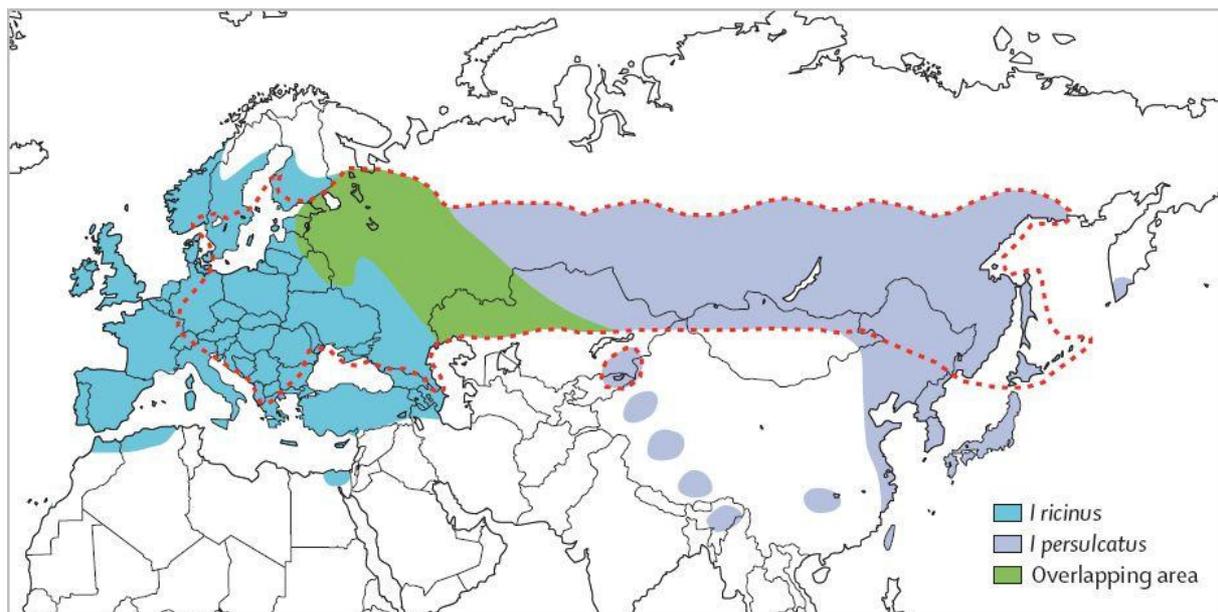


Abbildung 11: Verbreitungsgebiet von *Ixodes ricinus* (blau), *I. persulcatus* (lila) und sympatrisches Vorkommen der beiden Zeckenarten (grün). Die rot gestrichelte Linie begrenzt die bis jetzt bekannten TBE-Endemiegebiete. Quelle: Lindquist & Vapalathi (2008).

Von 1974 bis 2003 konnte ein Anstieg menschlicher FSME-Erkrankungen in Europa um 400 % beobachtet werden (Süss 2008). Zwischen 1990 und 2007 wurden durchschnittlich 8755 FSME-Infektionen pro Jahr in Europa und Russland registriert, im Vergleich zu durchschnittlich 2755 Fällen pro Jahr zwischen 1976 und 1989 (Süss 2008). Eine Impfung ist

der einzige wirkungsvolle Schutz gegen eine Erkrankung. Speziell in Österreich, wo eine Impfquote von mehr als 80 % besteht, kam es seit 1981 zu einem starken FSME-Rückgang in der menschlichen Bevölkerung (Heinz & Kunz 2004, Süss 2008, Mansfield et al. 2009).

Deutschland zählt zu den FSME-Endemiegebieten. Im Gegensatz zur Lyme-Borreliose besteht für die FSME eine bundesweite Meldepflicht. Besonders Süddeutschland ist von klinischen FSME-Fällen betroffen. Baden-Württemberg und Bayern, gefolgt von Hessen, zählen zu den Hochrisikogebieten (Abbildung 12). Die Inzidenz in den übrigen Bundesländern liegt unter 0,4 pro 100.000 Einwohnern. Seit Jahrzehnten wird beobachtet, dass es zu periodisch wiederkehrenden Schwankungen der FSME-Fälle während der Jahre kommt, was auf die Zecken- und Wirtspopulationsdynamik zurückgeführt wird (Zeman et al. 2010).

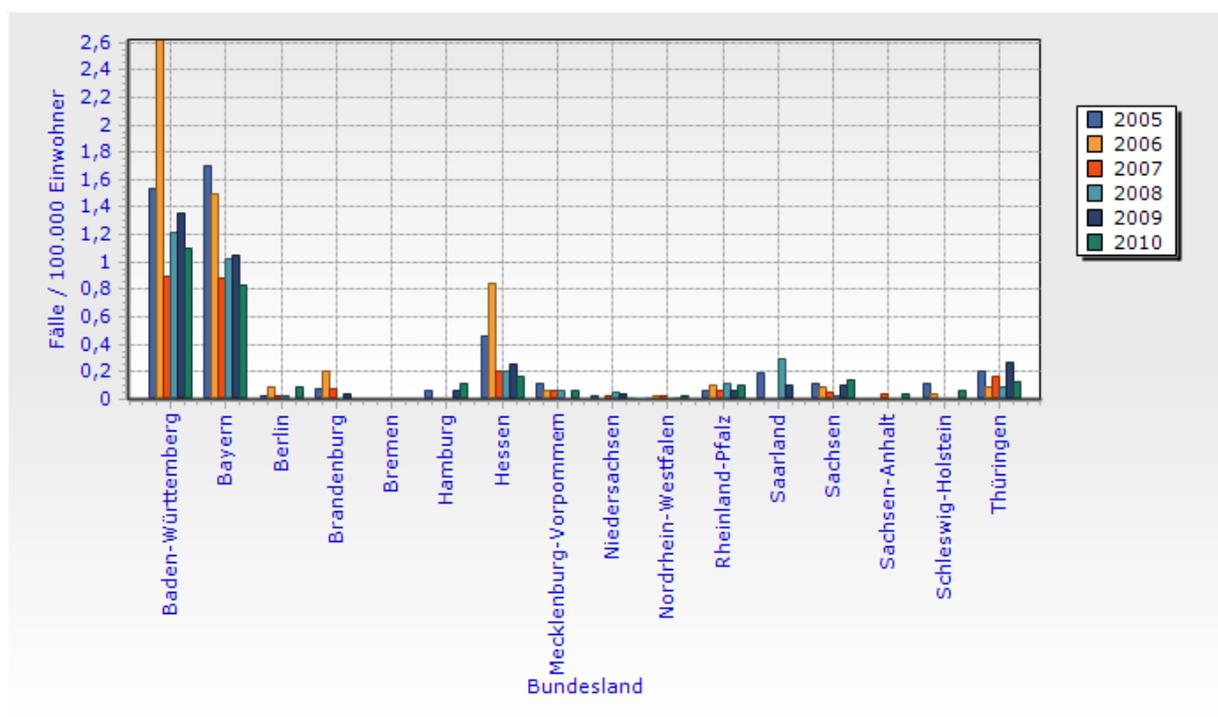


Abbildung 12: FSME-Fälle in Deutschland in den Jahren 2005-2010. Quelle: Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, Datenstand: <02.01.2011>.

FSME-Viren kommen endemisch in Naturherden in Waldgebieten über ganz Europa und Asien verteilt als Naturherde vor. Obwohl die Infektion auch bei domestizierten Tieren auftreten kann, zeigen diese meist keine Symptome (Mansfield et al. 2009).

Als natürliche Reservoirs gelten insbesondere kleine Säugetiere (Mansfield et al. 2009). Diese

können bei erstmaligem Kontakt mit FSME-Viren eine kurzzeitige Virämie ausbilden und tragen somit stark zur Verbreitung von infizierten Zeckenstadien bei. Nach einem wiederholten Kontakt kommt es zu einer lebenslangen Immunität. Trotz fehlender Virämie können immune Tiere aber als Co-feeding Wirt dienen (Labuda et al. 1997). Das gemeinsame Saugen von infizierten und nicht infizierten Zecken zur selben Zeit auf einem Wirt ist eine effiziente Übertragungsmethode und stellt das Zirkulieren von FSME-Viren in Naturherden sicher (Labuda et al. 1997). Zusätzlich zu diesen Übertragungswegen ist auch eine transovarielle Weitergabe des Virus von Zeckenweibchen auf deren Larven möglich (Danielova et al. 2002). Auch in Zecken von Zugvögeln wurden FSME-Viren nachgewiesen, was zu der Vermutung führt, dass diese über weite Strecken auch die russischen Subtypen nach Mitteleuropa einschleppen können (Golovljova et al. 2004, Waldenström et al. 2007, Mansfield et al. 2009).

Obwohl größere Tiere wie Wiederkäuer als wichtige Wirte für Zecken fungieren, sind sie in der Verbreitung von FSME-Viren nicht relevant (Gritsun et al. 2003, Mansfield et al. 2009). Allerdings können domestizierte Wiederkäuer eine Virämie ausbilden, was eine sehr effiziente Übertragungsrouten des Erregers auf den Menschen darstellt: vor Kurzem ereignete sich eine Reihe solcher Infektionen durch den Verzehr von nicht pasteurisierter Milch beziehungsweise Milchprodukten in Österreich und Ungarn (Holzmann et al. 2009, Balogh et al. 2010).

### **2.3.5.3 FSME-Viren als Krankheitserreger**

Die Mehrheit der FSME-Infektionen erfolgt durch einen Zeckenstich (Mansfield et al. 2009). FSME-Viren können eine schwerwiegend verlaufende Erkrankung des Nervensystems verursachen, die potentiell auch tödlich enden kann; jährlich werden tausende Neuinfektionen in ganz Europa und Eurasien gemeldet (Mansfield et al. 2009). Das Invaliditätsrisiko beträgt 10-30 % und die Letalität liegt bei ca. 1-3 % für den europäischen, 6-8 % für den sibirischen Subtyp und 20-40 % für den fernöstlichen Subtyp (Randolph & Rogers 2000, Atrasheuskaya et al. 2003, Mandl 2005, Mansfield et al. 2009).

Während die durch den fernöstlichen Subtyp verursachte Erkrankung einen monophasischen Verlauf zeigt, kommt es bei einer Infektion mit dem westeuropäischen Subtyp häufig zu einem biphasischen Verlauf (Gritsun et al. 2003, Mansfield et al. 2009). Die Inkubationszeit

beträgt normalerweise 7-14 Tage und geht in eine erste Phase mit einer kurzen Fieberperiode und Grippe-symptomen über (Kaiser 1999, Gritsun et al. 2003, Mansfield et al. 2009). Danach folgt oft eine 2-10 tägige asymptomatische Phase, die unmittelbar in die zweite Phase übergeht. Dieses Stadium ist durch starke Ausfallerscheinungen des zentralen Nervensystems und hohes Fieber gekennzeichnet. Es können Manifestationen in Form von Meningitis (Hirnhautentzündung), Enzephalitis (Gehirnentzündung), Myelitis (Rückenmarksentzündung) oder Radikulitis (Nervenwurzelentzündung) auftreten (Mansfield et al. 2009).

Die zugrunde liegenden Mechanismen, die den Viren das Vordringen in das zentrale Nervensystem ermöglichen und zu komplikationsreichen Schädigungen bis hin zum Tod führen können, sind nicht vollständig geklärt (Toporkova et al. 2008, Mansfield et al. 2009).

### 3 Material und Methoden

Die Evaluierung des Igels als Wirt für verschiedene zeckenübertragene Erreger erfolgte anhand vielfältiger Vorgehensweisen. Abbildung 13 gibt einen groben Überblick des verwendeten Probenmaterials und der gewählten Methode.

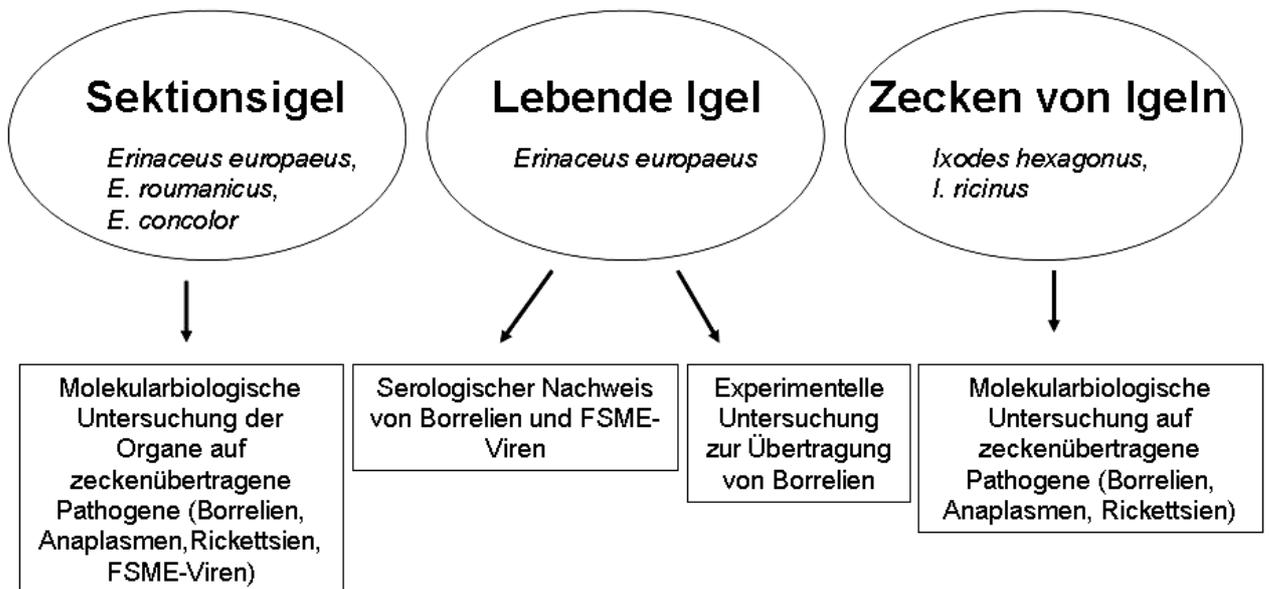


Abbildung 13: Überblick über das verwendete Probenmaterial und die gewählte Untersuchungsmethode.

## 3.1 Material

### 3.1.1 Sektionsigel

Für den direkten Nachweis von zeckenassoziierten Pathogenen in Igel (Borrelien, Anaplasmen, Rickettsien und FSME-Viren) wurden von 2005 bis 2008 Igel der Gattung *Erinaceus*, die in Igelstationen gestorben oder im Straßenverkehr getötet worden waren, eingeschickt beziehungsweise gesammelt. Die Igel stammten primär aus Deutschland, aber auch aus weiteren Teilen Europas (Großbritannien, Tschechien, Österreich und der Türkei) (Abbildung 14, Abbildung 15). Die toten Tiere wurden bis zur Sektion bei -20 °C tief gefroren.

Des Weiteren wurden Gewebeproben von natürlich verstorbenen Igel aus dem „Igelgarten“ auf die genannten Pathogene untersucht. Der „Igelgarten“ ist ein natürlich gestalteter, 1000 m<sup>2</sup> großer, mit Wellpolyester umzäunter Garten auf dem Gelände des Zoologischen Institutes der Universität Karlsruhe, Abteilung Ökologie/Parasitologie, in dem von 2005 bis 2009 eine experimentelle Igelpopulation von 30-40 Tieren untergebracht war. Die Tiere konnten sich frei bewegen, bauten sich Nester und verbrachten auch den Winterschlaf auf dem Gelände. Diese Tiere wurden im Rahmen einer parallel laufenden Doktorarbeit über 3 Jahre hinweg beobachtet, um den Einfluss von Makroparasiten auf verschiedene Fitnessparameter des Igel zu ermitteln (Pfäffle 2010).

### 3.1.2 Zecken von Igel

Für die Bestimmung der Prävalenz von Erregern (Borrelien, Anaplasmen und Rickettsien) in vollgesogenen Zecken von Igel wurden die DNA-Extrakte aus der Untersuchung von Perseke (2010) verwendet. Dabei handelte es sich um vollgesogene, in 70 % Ethanol konservierte Zecken, die 2006 von insgesamt 33 Igel abgesammelt worden waren. Die Zecken stammten von insgesamt 23 Sektionsigel (siehe Anhang, Tabelle 29) und von 10 Stationsigel aus Hamburg (n=5), Berlin (n=3) und Esslingen (n=2).

### 3.1.3 Blutproben von Igel

Für die serologische Untersuchung von Igel auf *Borrelia burgdorferi* s.l. und FSME-Viren wurden Blutproben von 3 Igelstationen (in Baden-Württemberg, Hessen und Hamburg) und

von Igeln aus dem „Igelgarten“ nach einer selbst entwickelten Blutabnahme-Methode (3.2.3) gewonnen.



Abbildung 14: Herkunftsorte der Sektionsigel aus West- und Mitteleuropa. Das ungefähre Einzugsgebiet der Igelstationen bzw. die Sammelorte sind grau unterlegt. **Deutschland:** 1 Hamburg (Hamburg), 2 Berlin (Berlin, vereinzelt Brandenburg), 3 München (Bayern), 4 Lottstetten (Baden-Württemberg), 5 Region Karlsruhe (Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz), 5\* „Igelgarten“ Karlsruhe (schwarzer Punkt), 6 Rhein-Main-Gebiet (Hessen), 7 Hooksiel (Niedersachsen); **Europa:** 8 Tschechien (Prag und Umgebung), 9 Österreich (Jennersdorf), 10 Wales (Cardiff und Umgebung), 11 England (York, Hull und Umgebung), 12 Schottland (Glasgow und Umgebung).



Abbildung 15: Herkunft der Igel (*Erinaceus concolor*) aus der Türkei/Provinz Bursa (dunkel eingefärbt). Quelle: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Locator\\_map-Bursa\\_Province.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Locator_map-Bursa_Province.png); Datum: 22.09.2010.

## **3.2 Allgemeine Methoden**

### **3.2.1 Sektion**

Zu jedem Tier wurde ein Sektionsprotokoll erstellt. Das ungefähre Alter (juvenil, subadult, adult) wurde anhand der Größe der Geschlechtsorgane und des Todeszeitpunktes (juvenil=gestorben vor erstem Winterschlaf, subadult=gestorben nach dem ersten Winterschlaf, adult  $\geq$  1 Jahr) bestimmt. Zusätzlich wurden die Tiere bezüglich ihres Gewichtes in 3 Kategorien eingeteilt (Gruppe 1: 100-500 g, Gruppe 2: 501-700 g, Gruppe 3: > 800 g).

Für die Bestimmung der Durchseuchungsrate von Igel mit verschiedenen Pathogenen wurden Gewebeprobe von Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere und Blase unter sterilen Bedingungen entnommen. Die dabei verwendeten Pinzetten und Scheren wurden nach der Entnahme jedes Organs abgeflammt, um eine Übertragung von eventuell vorhandenen Erregern von einem zum anderen Organ zu vermeiden.

Zuerst wurden 2x2x2 mm Gewebestücke von allen genannten Organen als „Organpool“ in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Des Weiteren wurde ein ca. 3x3x3 mm großes Gewebestück von den oben aufgeführten Organen entnommen, in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert. Da Erreger in Organen unterschiedlich verteilt sein können, wurde der Organpool zum groben Screening des Igels auf ein bestimmtes Pathogen mittels PCR genutzt. Bei einem positiven PCR-Ergebnis des Organpools wurden die Organe des jeweiligen Igels einzeln molekularbiologisch untersucht.

### **3.2.2 Bestimmung der Ektoparasiten**

Die Bestimmung der Art und des Entwicklungsstadiums der eingesandten Zecken wurde mithilfe von Bestimmungsschlüsseln von Arthur (1963) und Hillyard (1996) vorgenommen.

### **3.2.3 Blutabnahme und Serumgewinnung**

Die Blutabnahme der Igel erfolgte unter Anleitung von Dr. med. vet. Thomas Bücher nach einer selbst entwickelten, ohne Narkose funktionierenden Methode an der Vena saphena am Hinterbein des Tieres.

Vor Beginn der eigentlichen Blutabnahme wurde eine Einmalkanüle (grün Ø 0,80 mm x

25 mm) auf eine Multivette gesteckt. Danach wurde der Igel behutsam entrollt, das Hinterbein vorsichtig hervorgezogen und der Igel in abgebildeter Weise fixiert (Abbildung 16). Ein Stauschlauch für Kleintiere wurde am Hinterbein angelegt, um das zu punktierende Gefäß besser hervortreten zu lassen (Abbildung 17). Die Hautoberfläche wurde mit einem mit 70 % Ethanol getränkten Zellstofftupfer gut desinfiziert. In das hervortretende Gefäß wurde unmittelbar möglichst flach eingestochen und der Stauschlauch gelöst.



Abbildung 16: Vorsichtige Fixierung des Igels und Anbringung des Stauschlauches. Foto: Jasmin Skuballa.



Abbildung 17: Hinterbein mit hervortretenden Gefäßen (mit roten Pfeilen markiert). Foto: Jasmin Skuballa.



Abbildung 18: Durch Kapillarkräfte wird das Blut in die Multivette gezogen. Foto: Jasmin Skuballa.

Das Blut floss nun mithilfe der Kapillarkraft in die Multivette (Abbildung 18); dabei musste der Sitz der Kanüle überprüft und eventuell korrigiert werden. Läuft das Blut zu langsam, koaguliert es, und ein Blutklumpen verstopft das Röhrchen. In diesem Fall wurde die Blutabnahme sofort abgebrochen. Der Vorgang ist abgeschlossen, wenn die Multivette komplett mit Blut gefüllt ist. Nach der Blutabnahme wurde die Einstichstelle mittels Lotagen-getränktem Tupfer komprimiert und die einsetzende Blutstillung abgewartet.

Im Labor wurde das Blut für 10 min bei 16.000 g zentrifugiert, das erhaltene Serum anschließend auf mehrere gekennzeichnete 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -20 °C bis zur serologischen Untersuchung aufbewahrt.

### 3.2.4 Experimentelle Untersuchungen

Um zu überprüfen, ob Igel eine Infektion mit Borrelien entwickeln und erkranken, wurden 5 Tiere unter kontrollierten Bedingungen mit *Borrelia afzelii*-infizierten Zecken besetzt und anschließend in regelmäßigen Abständen xenodiagnostisch untersucht. Alle Untersuchungen an lebenden Tieren wurden vorher durch die Ethikkommission des Karlsruher Institutes für Technologie und durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt. Die entsprechenden Aktenzeichen sind den nachfolgenden Abschnitten zu entnehmen.

### 3.2.4.1 Material

#### **Zecken für die experimentelle Untersuchung**

Mit *Borrelia afzelii*-infizierte Weibchen (Infektionsrate > 80 %) und nicht infizierte Männchen von *Ixodes ricinus*, wurden von Dr. H. Dautel (Firma InsectServices) bereitgestellt.

Für die Xenodiagnose wurden im Labor gezüchtete, nicht infizierte *I. ricinus* Larven von Prof. Dr. L. Gern (Universität Neuchâtel) verwendet.

#### **Igel für die experimentelle Untersuchung**

Für den Versuch wurden 5 Igel der Art *Erinaceus europaeus*, die in Igelstationen groß gezogen worden waren, verwendet. Das Blut dieser Igel wurde mittels *Borrelia*-ELISA (siehe Kapitel 3.3.1.1) als seronegativ eingestuft. Bei der Erteilung der versuchstierrechtlichen Genehmigung (Regierungspräsidium Karlsruhe, Aktenzeichen: 35-9185.81/G-89/07) kam es zu Verzögerungen, weshalb die Versuche erst nach dem zweiten Winterschlaf beginnen konnten. Der Winterschlaf erfolgte in zeckenfreien Gehegen. Es handelte sich somit um 1,5 jährige Tiere.

### 3.2.4.2 Methoden

#### **Infektion der Wirtstiere mit *Borrelia afzelii***

Die Tiere wurden einzeln und unsediert mit 5 *Borrelia afzelii*-infizierten Weibchen und 5 uninfizierten *Ixodes ricinus* Männchen besetzt (Genehmigung durch das Regierungspräsidium Karlsruhe, Aktenzeichen: 24a-28/5002.44c). *I. ricinus* Männchen wurden gleichzeitig mit den Weibchen auf den Igel gesetzt, um einerseits die Befruchtung der Weibchen zu gewährleisten, aber auch andererseits den Saugerfolg zu maximieren (Dr. H. Dautel, persönliche Mitteilung). Einige Studien zum Paarungsverhalten von Zecken weisen darauf hin, dass während der Kopulation ein Protein vom Männchen abgesondert wird, das als Stimulus für die erfolgreiche Blutaufnahme des Weibchens dient (Weiss & Kaufman 2004). Für die Infektion wurde jeder Igel für 4 Stunden während des Tagesschlafes in einen verschlossenen, atmungsaktiven Leinensack gesetzt. Der Leinensack wurde vorsichtig in eine Schlafbox (40x20x20 cm)

gelegt, die wiederum in einer größeren Box (60x40x30 cm) stand, an deren Boden sich Löcher ( $\varnothing$  1 cm, Abstand 1 cm) befanden. Diese Box befand sich über einer mit Wasser gefüllten Schale, um ein Entweichen der Zecken sicher ausschließen zu können. Der Leinensack wurde nach 4 Stunden geöffnet und auf ungesogene Zecken untersucht. Die Igel wurden anschließend für 13 Tage einzeln in Edelstahlkäfigen (30x60x80 cm) mit Lochboden ( $\varnothing$  Löcher: 1 cm, Abstand 1cm) über einer Wasserschale gehalten, bis alle vollgesogenen *I. ricinus* Weibchen abgefallen waren.

Für die Dauer der xenodiagnostischen Untersuchung (12 bzw. 14 Wochen) wurde den Igeln zusätzlich die Schlafbox als Nestersatz in den Käfig gestellt. Der Ansatz von nicht infizierten Larven an die Igel erfolgte wie oben beschrieben. Das Wasser und der Käfig wurden täglich auf abgefallene Larven kontrolliert.

#### **Blutabnahme**

In regelmäßigen Abständen von 1 bis 2 Wochen wurde über einen Zeitraum von 12 bzw. 14 Wochen Blut abgenommen, das sowohl serologisch als auch mittels PCR auf Borrelien untersucht wurde.

#### **Xenodiagnose**

Die experimentell infizierten Tiere wurden in regelmäßigen Abständen von 1 bzw. 2 Wochen mit ca. 50 nicht infizierten Larven besetzt.

#### **Natürliche Infektion**

4 Igel, die mehrere Jahre im „Igelgarten“ verbracht hatten, und 2 Igel, die zuvor noch nicht im „Igelgarten“ waren, wurden für eine Woche einer natürlichen Zeckenexposition und somit einer *B. burgdorferi* s.l. Infektion im „Igelgarten“ ausgesetzt. Anschließend wurden sie aus dem Garten entnommen und wie oben beschrieben, 13 Tage in Käfigen über Wasser gehalten, bis alle Zeckenstadien abgefallen waren und ebenfalls in regelmäßigen Abständen über Xenodiagnose auf Borrelien untersucht. Zusätzlich wurde bei diesen Tieren eine Hautbiopsie am Oberschenkel des Hinterbeines von Dr. vet. med. T. Bücher unter Narkose (Ketamin

(30 mg/kg KGW) + Xylazin (3 mg/kg KGW)) mithilfe einer Biopsiestanze ( $\varnothing$  3 mm) entnommen und mittels PCR auf Borrelien getestet.

### **Ermittlung der Infektionsrate der gesaugten Zecken**

Gesogene Larven, die zur Xenodiagnose angesetzt worden waren, wurden in kleinen Reaktionsgefäßen im Exsikkator mit einer Luftfeuchte von  $> 95\%$  bis zur Häutung zur Nymphe aufbewahrt und anschließend mithilfe der PCR untersucht. Die vollgesogenen, mit *B. afzelii*-infizierten *I. ricinus* Weibchen wurden sofort nach dem Abfallen am Igel in 70 % Ethanol überführt und die tatsächliche Infektionsrate mittels PCR nachträglich ermittelt.

## **3.3 Immunbiologische Methoden**

### **3.3.1 ELISA**

Der ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) basiert auf der enzymatischen Umsetzung eines Substrates und dem Nachweis des Produktes, beispielsweise durch eine Farbveränderung oder Fluoreszenzlichtentwicklung.

Der ELISA wird in der Regel in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die kommerziell erhältlichen Kits enthalten meist mit Antigenen oder Antikörpern vorbeschichtete Platten. Für den Nachweis spezifischer Antikörper gegen einen bestimmten Erreger kann ein sogenannter indirekter ELISA eingesetzt werden. Nach erfolgter Bindung der nachzuweisenden primären Antikörper an das Antigen wird mit einem zweiten, anti-Spezies-spezifischen Antikörper (Konjugat) inkubiert, der seinerseits mit einem Enzym markiert ist. Der Umsatz eines Enzymsubstrates zeigt die Anwesenheit der primär nachzuweisenden Antikörper in Bindung mit den anti-Spezies-spezifischen Antikörpern in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte an.

#### **3.3.1.1 *Borrelia burgdorferi* s.l. ELISA**

Zur Testung der Igelseren auf spezifische *Borrelia*-Antikörper wurde das NovaLisa *Borrelia burgdorferi* IgG-ELISA rekombinant Kit verwendet. Jede der 96 Kavitäten der ELISA-Platte ist mit den Epitopen OspC der Stämme B31 (*B. burgdorferi* s.s.), 20047 (*B. garinii*) und T25 (*B. garinii*), sowie den Antigenen p100 und p18 von PKo (*B. afzelii*), p41i des Stammes PBi

(*B. bavariensis*) und VIsE aus verschiedenen Genospezies beschichtet.

Als Anti-Igel-Konjugat wurde ein Peroxidase-markiertes Protein G-Peroxidase-Konjugat (Calbiochem/Merck) an das ELISA-Kit angepasst. Protein G ist ein Zelloberflächenprotein von *Streptococcus* spp., das spezifisch an den Fc-Terminus von IgG verschiedener Tierarten bindet und somit universell für mehrere Spezies verwendbar ist („all species“-Konjugat).

Bei Vorhandensein spezifischer Antikörper wird die zugegebene TMB (Tetra-Methylbenzidine)-Substratlösung durch das Enzym des Konjugates umgesetzt, was durch eine Farbänderung von klar zu blau sichtbar wird. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung (Schwefelsäure; 0,2 mol/l) beendet. Es erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb.

### Testdurchführung

- **gewählte Probenverdünnung 1+100.** Je 10 µl Serum mit 1000 µl Probenverdünnungspuffer in 1,5 ml Eppendorf mischen (Vortex)
- zur Qualitätssicherung des Testes ist für die Vertiefung A1 der Substratleerwert, B1 die Negativkontrolle, C1+D1 die Cut-Off Kontrolle und für E1 die Positivkontrolle aus dem Kit vorgesehen. 100 µl Probe in jede Kavität zügig pipettieren
- Inkubation der Seren für 1h +/- 5 min bei 37 °C in feuchter Kammer
- dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen
- **gewählte Konjugatverdünnung 1+1000.** Zugabe von 100 µl Konjugat in jede Kavität, mit Ausnahme der für die Berechnung des Substratleerwertes
- Konjugatinkubation 30 min bei Raumtemperatur (20-25 °C)
- dreimal mit 300 µl Waschlösung waschen
- Zugabe von 100 µl TMB-Substratlösung in alle Vertiefungen
- Substratinkubation: genau 12 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20-25 °C)
- **Abstoppen der Reaktion** :100 µl Stopplösung in jede Kavität
- **Extinktionsmessung:** OD (Optische Dichte)-Messung mithilfe des SUNRISE Mikrotiterplatten-Photometers (ELISA-Reader) und der dazugehörigen Software (Magellan-Data Analysis) bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 620 nm). Die Messung wurde innerhalb von 30 min durchgeführt.

Da vor dieser Untersuchung kein Igelserum als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle zur Verfügung stand, wurde das Serum eines Igels, der in einer Igelstation geboren wurde, als Negativprobe und das Serum eines mehrjährigen Igels, der im „Igelgarten“ einer natürlichen Zecken-/Erregerinfektion ausgesetzt war, als Positivkontrolle eingesetzt. Zusätzlich wurden die beiliegenden Kontrollen des ELISA-Kits mitgeführt (Positivkontrolle, Cut-Off, Negativkontrolle).

### **3.3.1.2 FSME-ELISA**

Zur Testung der Igelseren auf spezifische FSME-Virus-Antikörper wurde das kommerzielle Testsystem Immunozytm FSME (TBE) IgG-All Species verwendet. Dieser Test beruht ebenfalls auf dem Einsatz eines „all species“-Konjugates (Protein G-Peroxidase) und wird in der Veterinärmedizin bei mehreren Säugetierarten (wie Hund, Pferd, Rind usw.) zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen FSME-Viren verwendet. Die ELISA-Platte ist mit inaktiviertem FSME-Virus beschichtet und für 96 Reaktionen konzipiert. Das Kit enthält neben einem „all species“-Konjugat sowie „high level“- und „low level“-Kontrollen zusätzlich 5 Kalibratoren aus lyophilisiertem Humanserum. Der Test wurde mit den dazugehörigen Kit-Komponenten nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Igelseren wurden 1+50 verdünnt, das beiliegende Konjugat 1+100. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm.

### **3.3.2 Immunblot**

Im Immunblot, auch Westernblot genannt, werden Proteine auf eine Trägermembran übertragen („blotting“) und anschließend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen. In der Diagnostik wird der Immunblot als Bestätigungstest des vorangegangenen ELISAs eingesetzt.

#### **3.3.2.1 *Borrelia burgdorferi* s.l. Immunblot**

Zur Bestätigung und Verifizierung der ELISA-Ergebnisse wurde der kommerziell erhältliche recomLine *Borrelia* IgG Immunblot eingesetzt. Das Testkit wurde für den Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* s.l. in humanem Serum, Plasma oder Liquor entwickelt.

Auf einem einzelnen Teststreifen sind insgesamt 15 rekombinant hergestellte, spezifische *Borrelia*-Antigene gegen alle der bislang humanpathogen geltenden Genospezies (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. spielmanii*) aufgetragen.

Als zweiter Antikörper wurde das Protein G Peroxidase-Konjugat (Calbiochem/Merck) verwendet. Die Auswertung der Blotstreifen erfolgte mithilfe der recomScan Software in Kooperation mit Herrn Dr. Göttner und Herrn Dr. Hofweber (Firma Mikrogen). Dabei wurden die Reaktivitäten in Relation zum Cut-Off (CO) Wert gesetzt. Ein Wert von z.B. 329,4 bedeutet, dass die Intensität der Antigenbande um 329,4 % höher war, als der Cut-Off Wert selbst (also mehr als 3 mal so stark). Bei negativen Werten (z.B. -21,6) war die Antigenbande schwächer als die Cut-Off Kontrollbande ausgeprägt, und wurde von der Software als negativ registriert. Nimmt man die offizielle Beurteilung eines Immunblots für menschliche Seren als Grundlage, ist das Ergebnis erst dann als positiv zu bewerten, wenn Antikörper gegen mindestens 2 hochspezifische Proteine nachgewiesen werden (2-Banden-Kriterium, MiQ-Richtlinie, Wilske et al. 2000). Beim Nachweis von Antikörpern gegen nur 1 hochspezifisches Protein handelt es sich um ein fragliches Ergebnis.

### **Testdurchführung**

Das Serum wurde 1:1000 verdünnt (15 µl auf 1,5 ml). Für den zweiten Inkubationsschritt wurde wiederum das Protein G-Peroxidase-Konjugat (Calbiochem/Merck) in einer Verdünnung von 1:2000 verwendet. Die Färbereaktion wurde auf 11 min festgelegt.

Die Auswertung und Dokumentation der Blotstreifen erfolgte durch die recomScan Software der Firma Mikrogen (2-Banden-Kriterium laut MiQ-Richtlinie). In Tabelle 4 sind die einzelnen Antigene des Blotstreifens, ihre Bezeichnung, ihre Herkunft sowie die Beurteilung ihrer Spezifität aufgeführt.

Tabelle 4: Rekombinante Borrelien-Antigene des recomLine *Borrelia* IgG-Immunoassays und die jeweilige Spezifitätsbeschreibung.

Antigen	Herkunft/Spezies	Spezifität
p100	<i>B. afzelii</i>	hoch spezifisches Protein, v.a. IgG-Marker in der Spätphase einer Infektion
VlsE	verschiedene <i>Borrelia</i> -Spezies	immundominantes (und trotzdem hoch-spezifisches) Antigen in der Borrelienserologie, wird nur in vivo exprimiert
p58	<i>B. garinii</i>	hohe Spezifität, unbekannte Funktion
p41	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	geringe Spezifität, Flagellin, Kreuzreaktivität mit anderen Spirochäten und begeißelten Bakterien bekannt
p39	<i>B. afzelii</i>	hochspezifisch, auch als BMPA bezeichnet
OspA	<i>B. afzelii</i>	wie OspC sehr spezifisch; hohe Titer beim Tier werden v.a. durch Impfung erreicht
OspC	<i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. spielmanii</i>	hohe Spezifität, v.a. bei IgM Bestimmung wichtig
p18	<u>p18 (B.b.s.s.)</u> aus Stamm B31 ( <i>B. burgdorferi</i> s.s.) <u>p18 (B.a.)</u> aus Stamm PKo ( <i>B. afzelii</i> ) <u>p18 (B.g.1)</u> = <i>B. bavariensis</i> ) aus Stamm PBi (syn. <i>Borrelia garinii</i> , OspA-Typ 4) <u>p18 (B.g.2)</u> aus Stamm 20047 ( <i>B. garinii</i> , OspA-Typ 9) <u>p18 (B.sp.)</u> aus Stamm PSig ( <i>B. spielmanii</i> )	p18-Antigene reagieren sehr spezies-spezifisch

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

### 3.4.1 Nukleinsäureextraktion

#### 3.4.1.1 DNA-Extraktion mithilfe der Chelex 100 Matrix

Die DNA-Aufreinigung der zu Nymphen gehäuteten Larven der experimentellen Infektion erfolgte nach der Chelex 100 Methode (Walsh et al. 1991). Dieser Methode liegt das Prinzip der Ionen-Austausch-Chromatographie zu Grunde. Chelex 100 ist ein Kationenaustauscherharz, das Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  chelatinisiert. Eine gleichzeitige Erhitzung während des Bindungsvorganges bewirkt, dass Zellmembranen zerstört, Zell-Lyse-Produkte sowie die Metallionen beseitigt werden, und die Nukleinsäuren am Ende der Aufreinigung denaturiert in der Lösung vorliegen.

Die DNA der Nymphen wurde einzeln extrahiert und in der anschließenden PCR in Pools zu je 5 Individuen getestet. Die Nymphen positiver Pools wurden danach einzeln untersucht.

Bei Anwesenheit von Hämoglobin ist Chelex 100 nur bedingt einsetzbar. Vollgesogene Zecken und Gewebeproben wurden daher mit dem automatisierten Maxwell-Verfahren aufgereinigt (siehe 3.4.1.2).

#### Aufreinigungsprotokoll

- 1 Zecke in 1 Schraubdeckelgefäß (1,5 ml) geben und mit 40 µl Chelex 100-Suspension (20 %) mischen
- mithilfe einer Impföse als Pistill wird die Zecke homogenisiert. Die Lösung wird anschließend gut gemischt (Vortex)
- 20 sek bei 4°C und 16.000 g zentrifugieren
- 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubieren
- 20 sek bei 4°C und 16.000 g zentrifugieren
- 10 min bei 100°C im Wasserbad inkubieren
- 20 sek vortexen und 3 min bei 16.000 g zentrifugieren
- 5 µl Überstand in die vorgesehene PCR einsetzen oder bei -20 °C aufbewahren
- bei Lagerung bei -20 C°: Auftauen der Proben für 10 min bei 56 °C im Wasserbad, für 3 min bei 16.000 g abzentrifugieren, 5 µl Überstand für die PCR verwenden.

### **3.4.1.2 DNA-Extraktion mithilfe des Maxwell 16 Instrumentes**

Das automatisierte Maxwell 16 System besteht aus dem vorprogrammierten Gerät und vorgefüllten Reagenzienkartuschen, die alle erforderlichen Bestandteile zur Nukleinsäureextraktion und paramagnetische Magnesil-Partikel (PMPs) enthalten.

Das Prinzip beruht auf der Freisetzung der Nukleinsäuren aus der Probe mithilfe eines Lyse-Puffers mit hohem Salzgehalt (Guanidinisothiocyanat). Aufgrund des hohen Salzgehaltes und des niedrigen pH-Wertes findet eine reversible Bindung der DNA/RNA an magnetische Silika-Partikel statt. Vorhandene Polysaccharide und Proteine werden durch mehrmalige Reinigungsschritte entfernt. Am Ende der Extraktion wird die DNA/RNA durch die Verwendung eines Elutionspuffers mit niedriger Salzkonzentration von den PMPs gelöst und liegt in Lösung vor.

Nachdem die PMPs das Ausgangsmaterial gebunden haben, transferiert ein magnetischer Stößel die Probenkomplexe in die einzelnen Kartuschen zur Lyse und Reinigung.

Für die Lyse von Gewebeproben wurden die Reagenzkartuschen Maxwell 16 Tissue DNA verwendet. Da ein maximaler Einsatz von 50 mg Gewebe laut Herstellerangaben nicht überschritten werden sollte, wurden die fünf 2x2x2 mm großen Gewebestücke der gepoolten Organproben vor dem Einsatz in das Gerät zerkleinert. Der Organpool wurde dafür mit 250 µl Lyse-Puffer versetzt, mit einem Plastikstößel gemörsert und 250 µl dieser homogenen Suspension zur DNA-Extraktion in die Kartuschen überführt. Einzelne Gewebestücke wurden ohne Vorbehandlung verwendet. Nach Beendigung des Durchlaufs wurden alle DNA-Extrakte in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und 1 µl RNasin zugegeben.

### **3.4.1.3 DNA-Isolierung mit dem QIAmp Viral RNA Mini Kit**

Die DNA der von Perseke (2010) auf Rickettsien untersuchten Zecken wurde mithilfe des QIAmp Viral RNA Mini Kit isoliert. Vor der Aufreinigung wurden die Zecken eines einzelnen Igels gepoolt und homogenisiert (Nymphen in Pools bis zu 5 Zecken, Larven in Pools bis zu 10 Zecken, adulte Zecken einzeln). Die Homogenisierung erfolgte in einem PBS (Phosphate Buffered Saline) Puffer ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  bei pH 7,5. Die detaillierte Durchführung der DNA-Isolierung ist in der Diplomarbeit von Perseke (2010) beschrieben.

### 3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion, engl. Polymerase chain reaction (PCR) werden in mehreren Schritten spezifische Nukleinsäuresequenzen, die nur in geringer Menge vorliegen, vervielfältigt. Für die PCR wird ein sequenzspezifisches, komplementäres Oligonukleotidpaar (Forward und Reverse Primer), eine thermostabile DNA-Polymerase und ein Mix der 4 Nukleotide Guanin (G), Adenin (A), Thymin (T) und Cytosin (C) benötigt. Die Primer haben eine Länge von 16-24 Basenpaaren und werden so ausgewählt, dass die Zielsequenz zwischen ihnen liegt. Die PCR wird in einem speziellen Gerät durchgeführt (Thermocycler), welches in der Lage ist, die Temperatur des Reaktionsblocks sehr rasch zu ändern. Verschiedene Temperaturen sind notwendig, um die DNA zunächst zu denaturieren (Bildung von Einzelsträngen bei 95 °C), dann die Anlagerung der Primer zu ermöglichen (sog. Annealing bei 50-65 °C) und schließlich die Elongation der Primer entlang der DNA-Matrize zu einem neuen Tochterstrang zu gewährleisten (Temperatur-Optimum der DNA-Polymerase bei 72 °C). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird auch PCR-Zyklus genannt und 30-40 mal wiederholt. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich idealerweise der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt, die Gesamtreaktion dauert etwa 1-2 Stunden. Auch geringste Spuren von DNA können mit dieser Methode nachgewiesen und diagnostischen Zwecken zugänglich gemacht werden.

Die Sensitivität und Spezifität einer PCR kann zusätzlich durch eine sogenannte nested PCR erhöht werden. Unter einer nested PCR versteht man eine „geschachtelte“ PCR aus 2 Reaktionen. Im ersten PCR-Lauf wird ein großes Produkt gebildet, das als Template für die zweite PCR eingesetzt wird. In der zweiten PCR wird dann ein DNA-Abschnitt vervielfältigt, der innerhalb des Amplifikationsproduktes der ersten PCR liegt. Werden die Primer der zweiten PCR so gewählt, dass sie komplett innerhalb des ersten Amplifikationsproduktes liegen, spricht man von einer nested PCR. Liegt nur ein Primer der zweiten Reaktion innerhalb der zu amplifizierenden Region und wird ein Primer der ersten Reaktion erneut verwendet, spricht man von einer semi-nested („halb-geschachtelten“) PCR.

Die hohe Sensitivität der PCR bedingt eine große Kontaminationsgefahr. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden folgende Sicherheitsaspekte berücksichtigt:

die DNA-Präparation, die Erstellung des Mastermixes für die PCR, die Zugabe der gereinigten DNA in die einzelnen PCR-Gefäße und die Durchführung der PCR erfolgten räumlich getrennt. Alle Pipettierschritte erfolgten unter einer sterilen Werkbank mit sterilen, gestopften Pipetten. Die Arbeitsplätze wurden über Nacht mit UV-Licht bestrahlt, um

eventuell vorhandene Rest-DNA zu zerstören.

Zur Minimierung falsch-positiver Befunde wurden bei allen Tests Negativkontrollen mitgeführt. Diese bestanden aus sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und wurde genauso behandelt wie die Proben. Des Weiteren wurde bei jedem Testdurchlauf mindestens eine Positivkontrolle mitgeführt.

### **3.4.2.1 Real-time PCR**

Eine weitere Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren ist die Real-time PCR (RT-PCR) oder quantitative Echtzeit-PCR, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht, aber die Detektion von positiven Proben bereits während des PCR-Laufs durch Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt. Dadurch entfällt zum einen der Nachweis der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese, zum anderen verringert sich aber auch die Kontaminationsgefahr. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zur PCR auf dem Thermocycler ist die Zeitersparnis.

Es gibt unterschiedliche Fluoreszenz-Nachweissysteme. Die einfachste Möglichkeit des Nachweises von PCR-Produkten besteht in der Nutzung von interkalierenden DNA-Farbstoffen (z.B. SYBR Green oder Ethidiumbromid). Des Weiteren können sequenzspezifische, mit Fluoreszenzstoffen markierte Sonden eingesetzt werden, bei denen die Energieübertragung zwischen 2 Fluorophoren („Fluorescence Resonance Energy Transfer“, FRET) genutzt wird.

Im Folgenden wird das Nachweisprinzip verschiedener Fluoreszenzsonden mittels LightCycler erläutert.

### **3.4.2.2 Real-time PCR mittels LightCycler**

Auf dem LightCycler erfolgt die PCR Reaktion im Gegensatz zur konventionellen PCR in Glaskapillaren, die lichtdurchlässig sind und durch die große Oberfläche schnelle Heiz- und Abkühlgeschwindigkeiten ermöglichen und somit die Reaktionsdauer verkürzen. Neben den Primern werden zusätzlich sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, die mit den gebildeten PCR-Produkten hybridisieren. Die Detektion von PCR-Produkten erfolgt nicht durch Visualisierung der PCR-Fragmente auf einem Agarosegel, sondern mittels Fluoreszenz, die nach jedem Reaktionszyklus gemessen wird und von der gebildeten Produktmenge abhängig ist. Durch das Wegfallen der Gelelektrophorese wird die

Kontaminationsgefahr deutlich reduziert. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass sich die Bildung der PCR-Produkte direkt am PC-Bildschirm verfolgen lässt („real-time PCR“).

### Hybridisierungssonden

Zur Genotypisierung von Proben können Hybridisierungssonden („hybridization probes“) eingesetzt werden, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Anker- und Sensorsonde).

Die Sonden binden in der Annealing-Phase an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern. Bei Proben, die die Zielsequenz enthalten, binden Anker- und Sensorsonde in unmittelbarer Nähe zueinander ( $\leq 5$  Basenpaare Abstand) und werden durch einen Lichtimpuls angeregt. Dadurch emittiert die Sensorsonde ein Lichtsignal von 530 nm, das den Farbstoff der Ankersonde anregt und zur Emission eines zweiten Signals führt (640 oder 705 nm), das von den Detektoren des LightCyclers gemessen wird. Der „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET) kann nur bei unmittelbarer Bindung der Sonden nebeneinander erfolgen. Dies verhindert die Anregung freier Sonden und damit eine Fehlbestimmung. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet; dadurch können mehr Sonden binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes an.

Abbildung 19 zeigt den schematischen Ablauf der OspA-PCR nach Rauter et al. (2002), mit deren Hilfe Borrelien anhand von Sondenhybridisierung und nachfolgender Schmelzpunktanalyse bis zur Genospezies in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden.

Nach Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen lagern sich in der Annealing-Phase der Forward Primer (OspA ilC), der mit einer LC Red 640 Sonde (Ankersonde) markiert ist, und der Reverse Primer (OspA as) an die komplementären Sequenzen an (Abbildung 19 A). Die Polymerase synthetisiert die komplementären Stränge. Während den folgenden PCR-Zyklen kommt es bei Vorhandensein von Borrelien-DNA in der Probe zu einer räumlichen Annäherung der mit Fluoreszein markierten Sensorsonde (Probe Ba2, die ihre Zielsequenz in unmittelbarer Nähe von der Ankersonde hat), an die mit LC Red 640 markierten DNA-Stränge. Der Farbstoff LC Red 640 sendet nun Licht der Wellenlänge 640 nm aus, welches vom LightCycler detektiert wird (Abbildung 19 B). Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Annealingphase gemessen und nimmt bei

entsprechender Produktbildung in exponentieller Weise zu.

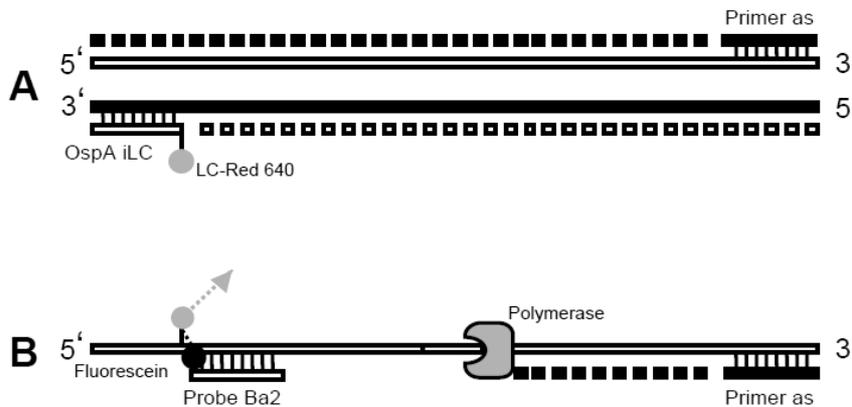


Abbildung 19: Schematischer Ablauf der *Borrelia* OspA-PCR auf dem LightCycler nach Rauter et al. (2002).

### TaqMan Sonden

TaqMan-Sonden, auch Hydrolyse-Sonden genannt, tragen an ihrem einen Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R) (entspricht Donor-Fluorochrom) und am anderen einen Quencher (Q). Quencher sind Moleküle, welche die Fluoreszenz von Farbstoffen in ihrer Nähe abfangen. Wenn die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, die an die Zielsequenz gebundene Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, entfernen sich Quencher und Reporter voneinander, sodass der Reporter ungehindert fluoreszieren kann. Die Fluoreszenz, die abhängig von der Menge des Amplifikationsproduktes ist, wird von den Detektoren des LightCyclers gemessen.

### 3.4.3 Spezifischer Nachweis von *Borrelia burgdorferi* s.l.

Für den spezifischen Nachweis von Borrelien in Gewebeproben wurden 2 PCR-Detektionssysteme verwendet. Eine zeitaufwendige, aber sehr sensitive und spezifische semi-nested PCR (5S23S rDNA-PCR) auf dem GeneAmp Thermocycler und eine OspA-PCR auf dem LightCycler. Von Igelrn abgesammelte Zecken wurden lediglich mit der letzteren Methode untersucht. Als Positivkontrolle diente Zellkultur von *Borrelia burgdorferi* s.s. (ca. 32 Borrelien pro  $\mu\text{l}$  in 40  $\mu\text{l}$  Chelex).

#### 3.4.3.1 5S23S rDNA-PCR

Extrahierte DNA eines Organpools wurde jeweils in **einem** PCR-Ansatz in einer 5S23S rDNA-PCR nach Rijpkema et al. (1995) getestet.

Diese semi-nested PCR hat als Zielsequenz den „intergenic spacer 2“ (IS2), der sich zwischen dem 5S rRNA Gen und dem 23S rRNA Gen befindet. In der ersten PCR-Reaktion wird ein 380 bp langes Stück amplifiziert, das als Ausgangsprodukt für die zweite PCR genutzt wird. Der Forward Primer ist bei der zweiten PCR, aus der ein 226 bp langes PCR-Produkt hervorgeht, um 128 Basen eingerückt.

#### Verwendete Primer der 1. PCR

23SN1(R1)	5`-ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC-3`
23SC1 (R2)	5`-TAAGCTGACTAATACTAATTACCC-3`

#### Reaktionsansatz der 1. PCR (50 $\mu\text{l}$ )

10 x Puffer	5 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (1 mM je dNTP)	10 $\mu\text{l}$
Tris HCl (300 mM)	6,7 $\mu\text{l}$
R1 (6 pmol/ $\mu\text{l}$ )	5 $\mu\text{l}$
R2 (6 pmol/ $\mu\text{l}$ )	5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	8 $\mu\text{l}$
AmpliTaq (5 U/ $\mu\text{l}$ )	0,3 $\mu\text{l}$
Probe (DNA Extraktion)	5 $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	50 $\mu\text{l}$

Temperaturprofil der 1. PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
94 °C	94 °C	52 °C	72 °C	72 °C	4 °C
1 min 30 sek	20 sek	30 sek	40 sek	5 min	∞
 35 Zyklen					

Verwendete Primer der 2. PCR

23SN2 (R3)	5`-ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA-3`
5SCB (R4)	5`-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG-3`

Reaktionsansatz der 2. PCR (50 µl)

10 x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP + Uracil (dUTP)	10 µl
Tris HCl (300 mM)	6,7 µl
R3 (6 pmol/µl)	5 µl
R4 (6 pmol/µl)	5 µl
H <sub>2</sub> O	11 µl
Ampli Taq AB (5 U/µl)	0,3 µl
Uracil-Glykosylase (1 U/µl)	0,5 µl
Probe (Amplifikationsprodukt der 1. PCR)	1,5 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Temperaturprofil der 2. PCR

Dekontaminationsschritt	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung	
37 °C	96 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
4 min	2 min	20 sek	30 sek	40 sek	5 min	∞
 35 Zyklen						

Die Amplifikationsprodukte der PCR wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese detektiert (siehe Abschnitt 3.4.7).

### 3.4.3.2 OspA-PCR mittels LightCycler

Das von Rauter et al. (2002) entwickelte PCR-Protokoll ermöglicht den Nachweis von mehreren Arten des *Borrelia burgdorferi* s.l. Komplexes mittels LightCycler. Nach der Amplifikation des PCR-Produktes folgt das Programm zur Erstellung der Schmelzkurve. Dieses beginnt mit der Denaturierung der Doppelstränge und wird anschließend bei 54 °C kontinuierlich bei einer Temperaturerhöhung von 0,1 °C/s bis 95 °C fortgesetzt. Dabei macht man sich die temperaturabhängige Hybridisierung der Sonden an die einzelsträngige DNA zunutze, die nicht nur von der Länge und dem GC-Gehalt abhängig ist, sondern auch vom Homologiegrad zwischen Ziel-DNA und Hybridisierungssonden. Auf diese Weise können Punktmutationen in der Ziel-DNA aufgespürt werden, da die Sonden zwar binden können, sich aber aufgrund der Mutation früher von der Ziel-DNA ablösen (pro Fehlerbase ca. 5 °C). Die Schmelzkurve weist für jede *Borrelia*-Genospezies ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei einer bestimmten Temperatur auf (Tabelle 5).

Tabelle 5: Absorptionsmaxima der unterschiedlichen *Borrelia*-Genospezies der OspA-PCR auf dem LightCycler nach Rauter et al. (2002).

<b><i>Borrelia</i>-Genospezies</b>	<b>Schmelzpunkttemperatur</b>
<i>B. spielmanii</i>	~ 58,6 °C
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	~ 62 °C (61,51-63,58 °C)
<i>B. garinii</i> und <i>B. bavariensis</i>	~ 67-68 °C
<i>B. afzelii</i>	~ 72 °C (71,78-73,66 °C)
<i>B. valaisiana</i>	~ 72 °C

## Durchführung

### verwendete Primer und Sonden

OspA iLC (Primer + Sonde) 5'-AgC CTT AAT AgC ATg YAA gCA AAA @X`Tg-3`  
(forward)

OspA as (reverse Primer) 5'-CTA gTg TTT TgC CAT CTT CTT TgA AAA-3`

OspA Sensor Ba2 (Sonde) 5'-gCg CTg TTT TTT TCA TCA Agg CTg CTA AC⊗X-3`

(@X`=LC Red 640-markierte Base. ⊗X=Fluorescein-markierte Base).

Reaktionsansatz OspA-PCR (20 µl)

H <sub>2</sub> O	8,8 µl
OspA as (5 pmol/µl)	2 µl
OspA ilc (10 pmol/µl)	1 µl
OspA Ba2 (10 pmol/µl)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,2 µl
Enzym-Mix (LC-Kit)	2 µl
Probe	2 µl
Gesamtvolumen	20 µl

MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und der Enzym-Mix wurden als Komponenten aus einem kommerziellen Kit (LightCycler DNA Master HybProbe) entnommen. Der vorgefertigte Enzymmix enthält neben einer DNA-Polymerase (Taq) auch einen dNTP Mix (mit dUTP anstatt dTTP), Reaktionspuffer und 10 mM MgCl<sub>2</sub>.

Temperaturprofil der OspA-PCR

	Temperatur (C°)	Zeit (sek)	Temp. Ab- bzw. Zunahme (°C/sek)	Anzahl der Zyklen	Messung
<b>Denaturierung</b>					
	95	30	20	1	keine
<b>Amplifikation</b>					
Denaturierung	95	1	20	60	keine
Annealing	57	10	20		einfach
Elongation	72	13	20		keine
<b>Schmelzpunktbestimmung</b>					
	95	5	20	1	keine
	54	10	20		keine
	95	0	0,1		kontinuierlich
<b>Kühlen</b>					
	40	30	20	1	keine

### 3.4.4 Spezifischer Nachweis von *Anaplasma phagocytophilum*

Der Nachweis von *Anaplasma phagocytophilum* sowohl in Organpools der Igel, als auch in den Zecken erfolgte mithilfe von 2 PCR-Systemen. Als Positivkontrolle wurde Zellkulturüberstand von *A. phagocytophilum* (Dr. S.E. Little, University of Georgia, USA und Dr. V. Fingerle, LGL Oberschleißheim) verwendet, der direkt in die PCR eingesetzt werden konnte.

#### 3.4.4.1 16S rDNA-PCR mittels LightCycler

Als Screening Methode wurde eine modifizierte LightCycler PCR nach Schaarschmidt-Kiener & Müller (2007) verwendet. Zielregion dieser PCR ist ein 344 bp langer Abschnitt der 16S rDNA. Die PCR ermöglicht den Nachweis von *Anaplasma* und *Ehrlichia* spp. mit einer nachfolgenden Schmelzpunktanalyse (Schmelzpunktdifferenz 3-5°C). Die Sonden wurden von Dr. D. Schaarschmidt (DSL-Labor, Eriskirch) entwickelt und zur Verfügung gestellt.

#### verwendete *Anaplasma/Ehrlichia* Primer und Sonden

EHR-For (forward Primer)	5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3'
EHR-Rev (reverse Primer)	5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3'
EHR-FL-Sens A (Sonde)	5'-TACTgACACTgAggTgCgAAAgC $\odot$ X-3'
EHR-LC-Anch Red 640 (Sonde)	5'- $\odot$ XTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA p-3'

( $\odot$ X'=LC Red 640-markierte Base.  $\odot$ X=Fluorescein-markierte Base).

#### Reaktionsansatz 16S rDNA-PCR (10 $\mu$ l)

EHR F (5 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
EHR R (5 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
EHR-FL-Sens A (4 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
EHR-LC Anch (4 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,2 $\mu$ l
Enzym-Mix (LC-Kit)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1,8 $\mu$ l
Probe	2 $\mu$ l
Gesamtvolumen	10 $\mu$ l

Temperaturprofil der 16S rDNA-PCR

	Temperatur (C°)	Zeit (sek)	Temp. Ab- bzw. Zunahme (°C/sek)	Anzahl der Zyklen	Messung
<b>Denaturierung</b>					
	95	120	20	1	keine
<b>Amplifikation</b>					
Denaturierung	95	1	20	45	keine
Annealing	55	16	20		einfach
Elongation	72	20	20		keine
<b>Schmelzpunktbestimmung</b>					
	95	15	20	1	keine
	40	15	20		keine
	95	0	0,1		kontinuierlich
<b>Kühlen</b>					
	40	120	20	1	keine

**3.4.4.2 16S rDNA-PCR**

Für den Erhalt eines 16S rDNA-Stückes, das in der Sequenzanalyse variabel genug ist, um verschiedene 16S rDNA-Varianten zu erkennen, wurden die in der LightCycler PCR positiv getesteten Proben zusätzlich einer nested PCR in Anlehnung an das Protokoll von Bown et al. (2003) unterzogen.

Verwendete Primer der 1. PCR

EE1 5'-TCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'

EE2 5'-GTCACTGACCCAACCTTAAATGGCTG-3'

Reaktionsansatz der 1. PCR (20 µl)

10 x Puffer	2,2 µl
dNTP Mix (2 mM je dNTP)	2,2 µl
EE1 (10 pmol/µl)	0,4 µl
EE2 (10 pmol/µl)	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	13,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Probe	1,5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Temperaturprofil der 1. PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4°C
2 min	30 sek	30 sek	1 min	5 min	∞
 35 Zyklen					

Verwendete Primer der 2. PCR

EE3 5`-GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC-3`

EE4 5`-CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3`

Reaktionsansatz der 2. PCR (20 µl)

10 x Puffer	2,2 µl
dNTP Mix (2 mM je dNTP)	2,2 µl
EE3 (10 pmol/µl)	0,4 µl
EE4 (10 pmol/µl)	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	13,8 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
Probe (Amplifikationsprodukt der 1. PCR)	1,0 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Temperaturprofil der 2. PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
95 °C	95 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4°C
2 min	30 sek	30 sek	1 min	5 min	∞


  
35 Zyklen

Die Amplifikationsprodukte der PCR wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese detektiert (siehe Abschnitt 3.4.7).

### 3.4.5 Spezifischer Nachweis von *Rickettsia* spp.

Der Nachweis von Rickettsien in Zecken und vereinzelt aus Organproben von Igel wurde weitgehend im Rahmen der Diplomarbeit von Perseke (2010) durchgeführt.

Lediglich die Organpools der Igel wurden in der vorliegenden Arbeit mittels einer TaqMan Real-time PCR des *gltA*-Gens nach Wölfel et al. (2006) auf Rickettsien überprüft. Als Positivkontrolle diente gereinigte DNA von *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* und *R. rickettsii* (Dr. U.G. Munderloh, University of Minnesota, USA und PD Dr. D. Hassler, Universität Heidelberg).

#### 3.4.5.1 *gltA*-PCR mittels LightCycler

Für die *gltA*-PCR auf dem LightCycler wurden eine Sonde und 2 Primer verwendet, die eine 70 bp lange Region des Citratsynthase-Gens (*gltA*) amplifizieren (Wölfel et al. 2006). Der Nachweis der Amplifikation erfolgte mithilfe einer TaqMan-Sonde (siehe Abschnitt 3.4.2.1)

#### verwendete *Rickettsia* Primer und Sonde

PanRick *gltA* 2 for (forward Primer) 5'-ATAggACAACCgTTTATTT-3'

PanRick *gltA* 2 rev (reverse Primer) 5'-CAAACATCATATgCAgAAA-3'

PanRick *gltA* taq (Sonde) 5'-6FAM-CCTgATAATTCgTTAgATTTTACCg-TMR-3'

Reaktionsansatz glta-PCR (20 µl)

PanRick gltA 2 for (5 pmol/µl)	2 µl
PanRick gltA 2 rev (5 pmol/µl)	2 µl
PanRick gltA 2 taq (4 pmol/µl)	1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl
Enzym-Mix (LC-Kit)	2 µl
H <sub>2</sub> O	6,4 µl
Probe	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Temperaturprofil der glta-PCR

	Temperatur (C°)	Zeit (sek)	Temp. Ab- Zunahme (°C/sek)	bzw.	Anzahl der Zyklen	Messung
<b>Denaturierung</b>						
	94	60	20		1	keine
<b>Amplifikation</b>						
Denaturierung	94	4	20	55	55	keine
Annealing	55	45	20			einfach
<b>Elongation</b>	72	30	20			keine
<b>Kühlen</b>						
	40	30	20		1	keine

Fluoreszenzmessung: „single“ während Annealing bei 530 nm

### 3.4.6 Spezifischer Nachweis von FSME-Viren

#### 3.4.6.1 Reverse Transkription mithilfe der AMV-Transkriptase

Die mit dem Maxwell Tissue Kits aufgereinigten Organpools wurden auf das Vorhandensein von FSME-Viren folgendermaßen überprüft: vor der eigentlichen PCR-Reaktion musste die isolierte einzelsträngige, virale RNA in eine (komplementäre) cDNA umgeschrieben werden (Reverse Transkription, RT). Dies erfolgte durch das Enzym „AMV Reverse Transkriptase“, einem vom Hersteller modifizierten Enzym eines Retrovirus (Avian Myeloblastosis Virus). Alle Bestandteile der RT-PCR wurden aus dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) entnommen.

#### Reaktionsansatz für die Reverse Transkription (20 µl)

10 x Puffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
TBE 1 (30 pmol/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O	4,2 µl
RNasin (50 U/µl)	1 µl
AMV (25 U/µl)	0,8 µl
Probe (Eluat)	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl

#### Temperaturprofil der Reversen Transkription

<b>Transkription</b>	<b>Transkription</b>	<b>Denaturierung</b>	<b>Kühlung</b>
25 °C	42 °C	98 °C	4 °C
10 min	60 min	5 min	∞

### 3.4.6.2 FSME-PCR

Für den Nachweis von FSME-Viren wurde eine spezifische FSME-PCR nach Schrader & Süss (1999) auf dem Thermocycler durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Zellkulturüberstand des FSME-Virusstammes Hypr (Dr. G. Dobler, Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München).

In der ersten PCR wurde ein 191 bp langes Fragment aus dem nicht codierenden Bereich am 5'-Ende des Virusgenoms, welches hoch konserviert ist, mit spezifischen Primern amplifiziert. In der zweiten PCR wurde ein 172 bp langes DNA-Fragment vervielfältigt.

#### Verwendete Primer der 1. PCR

TBE1 5'-GCGTTTGCTTCGGACAGCATTAGC-3'

TBE2 5'-GCGTCTTCGTTGCGGTCTCTTTTCG-3'

#### Reaktionsansatz der 1. PCR (50 µl)

10 x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl
dNTP (1,25 mM)	5 µl
TBE1 (5 pmol/µl)	6 µl
TBE2 (5 pmol/µl)	6 µl
H <sub>2</sub> O	23,2 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Probe (cDNA)	2 µl
Gesamtvolumen	50 µl

#### Temperaturprofil der 1. PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C	4 °C
1 min	30 sek	30 sek	30 sek	3 min	∞


  
40 Zyklen

Verwendete Primer der 2. PCR

TBE3 5`-TCGGACAGCATTAGCAGCGGTTGG-3`

TBE4 5`-TGCGGTCTCTTTTCGACACTCGGTCG-3`

Reaktionsansatz der 2. PCR (50 µl)

10 x Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µl
dNTP (1,25 mM)	5 µl
Primer TBE 1 (5 pmol/µl)	6 µl
Primer TBE 2 (5 pmol/µl)	6 µl
H <sub>2</sub> O	23,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Probe (Amplifikationsprodukt der 1.PCR)	1 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Temperaturprofil der 2. PCR

Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Elongation	Kühlung
94 °C	94 °C	60 °C	72 °C	72 °C	4 °C
1 min	30 sek	30 sek	30 sek	3 min	∞
 35 Zyklen					

Die Amplifikationsprodukte der PCR wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese detektiert (siehe Abschnitt 3.4.7).

### 3.4.7 Visualisierung der PCR-Produkte im Agarosegel

Die auf dem Thermocycler gewonnenen PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. Dabei werden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Basengröße im elektrischen Feld aufgetrennt, wobei die negativ geladenen, doppelsträngigen DNA-Fragmente in Richtung des Pluspols wandern. Das im Gel befindliche Ethidiumbromid (EthBr) ermöglicht die Detektion der einzelnen DNA-Fragmente, indem es mit den DNA-Doppelsträngen interkaliert und bei Anregung durch UV-Licht fluoresziert. Zusätzlich zu den PCR-Produkten wurde ein definierter Marker (100 Base Pair Ladder) aufgetragen, um die DNA-Fragmente mit dem Längenstandard vergleichen zu können. Des Weiteren wurde stets eine Positivkontrolle mitgeführt, die eine Bande an der entsprechenden Stelle des amplifizierten DNA-Fragments aufweisen muss.

#### 3.4.7.1 Agarosegel für Nachweis der untersuchten Erreger

Für den Nachweis der Amplifikate der Borrelien-PCR (5S-23S rDNA-Fragmente) sowie von 16S rDNA-Fragmenten der *Anaplasma* nested PCR wurde ein 1,5 %iges Agarosegel wie folgt hergestellt und beladen:

- 0,75 g Agarose mit 50 ml TBE-Puffer (1 x) in einem Glaskolben vermischen und auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren zum Kochen bringen
- auf ca. 45 °C abkühlen lassen und 11 µl eine 0,1 % Ethidiumbromidlösung hinzugeben
- flüssiges Gel in eine Gelkammer mit Kämmen zur Taschenbildung gießen und ca. 30 min auspolymerisieren lassen
- das auspolymerisierte Gel in eine Elektrophorese Kammer (gefüllt mit 1 x TAE-Puffer) geben und die Taschen mit 8 µl Probe und 2 µl Ladepuffer befüllen
- die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von ca. 80 V für ca. 30 min

Für den Nachweis der in der nested PCR gebildeten FSME-Fragmente (172 bp) wurde ein 2 %iges Agarosegel (1 g Agarose mit 50 ml 1 x TBE-Puffer) hergestellt. Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von ca. 70 V für ca. 30-40 min.

### 3.4.8 Sequenzierung

Um die Spezifität der PCR zu überprüfen, bzw. zur Bestimmung der jeweiligen Erreger-Arten, wurden alle positiven Organproben von Igel sequenziert. Positive Zecken wurden aus Kostengründen nur stichprobenartig sequenziert.

Die Sequenzierreaktion wurde mithilfe des BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und des ABI PRISM 310 Genetic Analyzers auf der Grundlage des „Kettenabbruchverfahrens“ durchgeführt. Für die Sequenzierreaktion werden 4 Abbruchbasen mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet, die bei ihrer Anregung durch einen Laser Licht verschiedener Wellenlänge abgeben. Den markierten Abbruchbasen (Didesoxynukleotidtriphosphate; ddNTPs) fehlt die Hydroxylgruppe am 3'-Ende, sodass es nach ihrem Einbau in der Elongationsphase zum Kettenabbruch kommt. Auf diese Weise entstehen DNA-Bruchstücke unterschiedlicher Länge, die im Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Bei der Sequenzierung mit dem Sequenzierautomat ABI Prism 310 Genetic Analyzer sind die 4 Abbruchbasen (ddNTPs) jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und emittieren bei ihrer Anregung Licht unterschiedlicher Wellenlänge. Dadurch kann die Reaktion in einem Gefäß pro Probe ablaufen.

#### 3.4.8.1 Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierreaktion

Um die vorhandene DNA möglichst rein, d.h. ohne andere aus der PCR-Reaktion verbliebene Bestandteile zu erhalten, wurde vor der eigentlichen Sequenzierreaktion eine Aufreinigung der Amplifikate mit dem QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt.

#### Aufreinigungsprotokoll

- Das 5-fache des Volumens an PB-Puffers (mit hoher Salzkonzentration und pH-Wert  $\leq 7,5$ ) auf das PCR-Produkt geben, mischen und kurz abzentrifugieren
- Probe auf kleine Säulen (mit Silika-Gel Membran) pipettieren, wobei die vorhandenen DNA-Fragmente aufgrund des hohen Salzgehaltes an die Membran binden
- Zentrifugationsschritt für 1 min bei 16.000 g
- Waschschrift mit 750  $\mu$ l PE-Puffer (1:5 mit Ethanol verdünnt), wodurch Verunreinigungen wie Salze, Enzyme, ungebundene Primer und freie Nukleotide entfernt werden

- Zweimalige Zentrifugation für 1 min bei 16.000 g, Flüssigkeit verwerfen
- Säule für 10 min im Hybridisierungs-ofen bei 56 °C trocknen, um Reste von Ethanol zu entfernen
- Zugabe von 100 µl Elutionspuffer mit geringem Salzgehalt (10 mM Tris-Cl, pH 8,5)
- Zentrifugation bei 16.000 g für 1 min, wodurch sich die gereinigte DNA von der Membran ablöst
- Eluat bei -70 °C tief gefrieren oder sofort in die Sequenzierreaktion einsetzen

### 3.4.8.2 Sequenzierreaktion

Die Sequenzierreaktion oder Sequenzreaktion („cycle sequencing“), die auf einem Thermocycler erfolgte, wurde mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit angesetzt. Der BigDye (v1.1) Mix enthält ein Stoffel-Fragment der AmpliTaq DNA-Polymerase (diese besitzt keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität), BigDye Terminatoren (Abbruchbasen), dNTPs (dITP anstatt dGTP und dUTP anstatt dTTP), rTth Pyrophosphatase, MgCl<sub>2</sub> und Puffer. Die AmpliTaq dient dazu, das Amplifikat zu vermehren und gleichzeitig die Abbruchbasen für die Sequenzierung einzubauen.

#### Reaktionsansatz Sequenzierreaktion (20 µl)

BigDye Seq. Puffer (5 x)	2 µl
Primer (entweder forward oder reverse) (5 pmol/µl)	2 µl
H <sub>2</sub> O	7 µl*
BigDye (v 1.1) Mix	4 µl
Probe (aufgereinigte DNA) 10-100 ng	5 µl*
Gesamtvolumen	20 µl

\* bei schwach positiven Proben wurden 5 µl DNA, bei stark positiven Proben wurde weniger DNA (z.B. nur 2 µl des PCR-Produktes) zugegeben und H<sub>2</sub>O (z.B. 10 µl) dementsprechend angepasst.

Temperaturprofil der Sequenzierreaktion

Denaturierung	Annealing**	Elongation	Kühlung
96 °C	°C	60 °C	4 °C
10 sek	60 sek	4 min	∞


  
25 Zyklen

\*\* Temperatur wurde entsprechend der Schmelztemperatur der verwendeten Primer bzw. analog der Annealing-Temperatur der jeweiligen PCR-Reaktion angepasst.

**3.4.8.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte**

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Proben mit 2 µl 2,2 % SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) versetzt, für 3 min bei 94 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Dieses Vorgehen diente dazu, nicht eingebaute, zusammengelagerte ddNTPs-Farbstoffklumpen aufzulösen, die einen störenden Einfluss auf die anschließende Kapillargelelektrophorese haben könnten.

Die während der Sequenzierreaktion nicht verbrauchten Bestandteile (Terminatoren, dNTPs, Primer und Salze) wurden mithilfe des DyeEx 2.0 Spin Kits entfernt. Dabei werden DNA-Fragmente (> 16 Basenpaare) über eine Gelfiltration in Lösung gebracht, während die nicht erwünschten Bestandteile der Sequenzierreaktion im Gel zurückgehalten werden.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. 4 µl der aufgereinigten DNA-Lösung wurden anschließend mit 20 µl Hi-Di Formamid versetzt, für 2 min bei 94 °C denaturiert, auf Eis inkubiert und in den ABI Prism 310 Genetic Analyzer eingesetzt.

**3.4.8.4 Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer**

Für die Kapillargelelektrophorese mithilfe des ABI Prism 310 Genetic Analyzer wurde das Gel Performance optimized Polymer 6 (Pop-6) verwendet. Die Sequenzierprodukte wurden in der Kapillare entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld bei 15.000 V aufgetrennt. Die Kapillare besitzt einen durchsichtigen Bereich, in dem ein Laserstrahl die jeweilige fluoreszenzmarkierte Base anregt. Das emittierte Licht der jeweiligen Kettenabbruchbase wird von einer Photozelle detektiert und die Rohdaten mithilfe eines Computers in die entsprechende Sequenz übersetzt.

### 3.4.8.5 Auswertung der Sequenzdaten

Die Richtigkeit der Basen wurde überprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Besonders am Anfang und Ende der Sequenz und bei Überlagerungen von 2 Basen war eine manuelle Korrektur erforderlich. Die DNA-Sequenzen wurden mithilfe von BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mit vorhandenen Dateneinträgen auf GenBank (NCBI Taxonomy Datenbank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen. Zur Auswertung der Elektropherogramme wurden die frei verfügbaren Programme FinchTV (Geospiza, Version 1.4) und Mesquite Software, Inc. (Version 2.74) verwendet.

### 3.4.9 Klonierung

Die Klonierung wurde im Rahmen eines 4-wöchigen Aufenthalts an der Universität Edinburgh (Prof. M. Blaxter, Institute of Evolutionary Biology) durchgeführt.

Unter dem Begriff Klonierung sind in der Molekularbiologie Methoden aufgeführt, die zur Gewinnung und Vervielfältigung von identischem DNA-Material eingesetzt werden. Dabei wird das gewünschte PCR-Produkt zuerst in einen Vektor (Plasmid) integriert und anschließend in kompetente Wirtszellen (z.B. *Escherchia coli*) eingeschleust (Transformation). Durch die Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor kann ein Gen über die Klonierungsstelle (engl. multiple cloning site, MCS) deaktiviert werden. Bei der Blau-Weiß-Selektion wird beispielsweise das lacZ-Gen, ein Gen der  $\beta$ -Galactosidase, durch die Insertion von Fremd-DNA unterbrochen. Bakterienzellen, die erfolgreich transformiert wurden, können dieses Enzym nicht mehr synthetisieren und zeigen bei der Zugabe des spezifischen Substrats (X-Gal) eine weiße Färbung. Nicht erfolgreich transformierte Zellen können dieses Substrat umsetzen und erscheinen dagegen dunkelblau.

#### 3.4.9.1 Klonierung von PCR-Produkten

Zur Detektion von möglichen Koinfektionen mit unterschiedlichen 16S rDNA-Varianten von *Anaplasma phagocytophilum* im Wirtstier Igel wurde das Amplifikat eines positiven Organpools, das in der Sequenzierung überlagerte Basenpaare aufwies, probeweise kloniert.

Vor der Klonierung wurde das PCR-Produkt mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt (siehe 3.4.8.1).

Für die Klonierung wurde das PCR II TOPO TA Cloning Kit und die dazugehörige

Arbeitsanleitung (TOPO TA Cloning, Invitrogen) verwendet. Durch ein 1-Schritt Vorgehen ("TOPO Cloning-Reaction") wird das PCR-Produkt direkt in einen Plasmid-Vektor eingebaut. Bei der PCR-Reaktion synthetisiert die Taq-Polymerase Matrizen-unabhängig an die 3'-Enden des Amplifikates überhängende Adeninreste (A). Der zunächst linear vorliegende pCRII TOPO Vektor enthält überhängende Thymidinreste (T), die mit den überhängenden Adeninresten hybridisieren. Zusätzlich ist an den Vektor eine Topoisomerase I (aus dem *Vaccinia Virus*) kovalent gebunden, durch deren Aktivierung das PCR-Produkt in den Vektor eingebaut wird (Abbildung 20), wodurch ein separater Schritt zur Ligation in den Vektor entfällt.

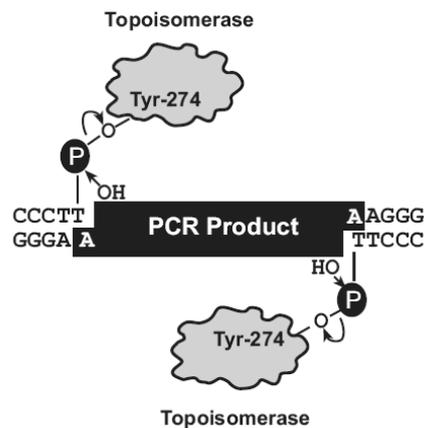


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Insertion des PCR-Produktes in den Plasmidvektor.

Der Vektor besitzt neben Resistenzgenen für Kanamycin und Ampicillin das lacZ-Gen, das durch die Klonierungsstelle, innerhalb der die Insertionsstelle für das PCR-Produkt liegt, unterbrochen wird (siehe Anhang: Abbildung 37). Durch die Verwendung universeller Primer (M13 F und M13 R) für den Plasmidvektor benötigt man keine spezifischen Primer bei der Sequenzierreaktion.

#### Reaktionsansatz der TOPO Klonierung (6 µl)

PCR-Produkt	1 µl
Salt Solution (aus Kit)	1 µl
H <sub>2</sub> O	3,5 µl
Vektor (pCRII-TOPO)	0,5 µl
Gesamtvolumen	6 µl

Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.4.9.2 Transformation

Zur Transformation des Plasmidvektors in einen *E. coli* Stamm, wurden *E. coli* TOP 10 chemisch kompetente Zellen des One Shot Kits und die dazugehörigen Komponenten verwendet.

- 2 µl der vorangegangenen „TOPO-Cloning“ Reaktion auf Eis zu den *E. coli* Zellen pipettieren und 20 min inkubieren
- Hitzeschock der Zellen bei 42 °C für 30 sek
- Zugabe von 250 µl S.O.C-Medium auf Eis
- Zellen für 1 Stunde bei 37 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubieren
- 250 µl S.O.C-Medium zusätzlich zum Reaktionsansatz pipettieren und jeweils 20 µl und 50 µl auf vorgewärmte selektive LB-Kanamycin/X-Gal Platten auftragen
- ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren
- bei erfolgreicher Inkubation haben sich über Nacht blaue und weiße Kolonien gebildet. Weiße Kolonien haben das PCR-Produkt eingebaut. 6 weiße Kolonien wurden von jeder Platte mit einer sterilen 10 µl Pipettenspitze gepickt und in jeweils eine Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte mit jeweils 150 µl LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt.
- Mikrotiterplatte bei 37 °C über Nacht inkubieren.
- am nächsten Tag 2 µl aus einer Kavität entnehmen und in den PCR-Ansatz geben

#### Reaktionsansatz der PCR (20 µl)

Probe	2,0 µl
Primer M13 F (aus Kit)	0,4 µl
Primer M13 R (aus Kit)	0,4 µl
10 x Puffer (aus Kit)	2,2 µl
dNTP-Mix (2 mM je dNTP)	2,2 µl
H <sub>2</sub> O	13,2 µl
Taq	0,08 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Temperaturprofil der PCR

<b>Denaturierung</b>	<b>Denaturierung</b>	<b>Annealing</b>	<b>Elongation</b>	<b>Elongation</b>	<b>Kühlung</b>
94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
2 min	1 min	1 min	1 min	7 min	∞

  
35 Zyklen

Nach Visualisierung der gebildeten PCR-Produkte mithilfe Agarose-Gelelektrophorese wurde mit den Amplifikaten wie unter 3.4.8 beschrieben, weiter verfahren.

## 3.5 Verwendete Geräte und Reagenzien

### 3.5.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Geräte		verwendet für:
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen	Allgemein
DURAN® Exsikkator	Schott/Duran, Mainz	Allgemein
Eismaschine (Scotsman AF-80)	Scotsman Eismaschinen, Erfurt	Allgemein
Elektrophoresekammer	Biorad, München	Gel-Elektrophorese
Geldokumentationssystem Bioprofil®	LTF Labortechnik, Wasserburg	Gel-Elektrophorese
Hybridisierungs-ofen	Bachofer, Reutlingen	Sequenzierung
Kühlschränke	Liebherr, Biberach	Allgemein
Kühlzentrifuge (5402, 5804 R)	Eppendorf, Hamburg	Allgemein
LightCycler® 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim	PCR
Maxwell™ 16	Promega, Mannheim	Nukleinsäureextraktion
Mikrotiterplatten-Photometer (TECAN Sunrise™)	Tecan, Crailsheim	ELISA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg	Allgemein
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach	Allgemein
Sequenzierer (ABI Prism® 310 Genetic Analyzer)	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
Sterile Werkbank	BDK, Sonnenbühl	Allgemein
Thermocycler: GeneAmp® PCR System 2400 und 9700	Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR
Tiefkühlschränke (-20°C,-70°C)	Kendro, Hanau; Bosch, Gerlingen	Allgemein
Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415D)	Eppendorf, Hamburg	Blutabnahme
Vortex™ (Genie 2M)	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz	Allgemein
Wasserbad	GFL, Burgwedel	Allgemein
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg	Allgemein
Zentrifuge (Varifuge K)	Heraeus, Osterode	Allgemein
Zentrifuge (Z233M-2)	Hermle, Wehingen	Allgemein

<b>Reagenzien</b>		<u>verwendet für:</u>
100 bp Ladder	Amersham Pharmacia, Freiburg	Gel-Elektrophorese
AmpliTaq® DNA-Polymerase (Thermocycler PCRs), incl. 10 x Puffer, MgCl (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR
Baytril®, 2,5 %	Bayer Health Care, Leverkusen	Allgemein
Borsäure	Merck, Darmstadt	Gel-Elektrophorese
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Gel-Elektrophorese
Chelex® 100	Bio-Rad, München	Nukleinsäureextraktion
Diethylpyrocarbonat (DEP)	Fluka/Sigma-Aldrich, Steinheim	Allgemein
dNTP-Set (100 mM Solutions)	GE Healthcare, München	PCR
dUTP	Fermentas, St. Leon-Rot	PCR
EDTA	Merck, Darmstadt	Allgemein
Ethanol (absolut)	Merck, Darmstadt	Allgemein
Ethidiumbromid 1 %	Merck, Darmstadt	Gel-Elektrophorese
Ficoll	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Gel-Elektrophorese
Guanidinisothiocyanat	Carl Roth, Karlsruhe	Nukleinsäureextraktion
HiDi™ Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
Ketamin®, 10 %	Ceva, Sante Animale, Düsseldorf	Allgemein
Lotagen® Konzentrat	Essex Tierarznei, München	Blutabnahme
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt	Allgemein
Magnesiumchlorid (25 mM)	Applied Biosystems, Weiterstadt	PCR
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt	Allgemein
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg	Sequenzierung
Nukleasefreies Wasser	Promega, Mannheim	Allgemein
peq Gold® Universal Agarose	Peqlab, Erlangen	Gel-Elektrophorese
Performance optimized Polymer 6 (POP-6)	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
Primer	Tib Mol, Berlin	PCR
RNasin	Promega, Mannheim	Nukleinsäureextraktion
Salzsäure 25 %	Merck, Darmstadt	Allgemein
Taq Polymerase incl. 10 x Puffer, Magnesiumchlorid (25 mM)	Promega, Mannheim	PCR (FSME)
Hi-Di Formamid	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
Tris-HCl	Merck, Darmstadt	Allgemein
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	Nukleinsäureextraktion
Uracil-DNA-Glykosylase	Fermentas, St. Leon-Rot	PCR
Xylazin®, 2 %	Ceva, Sante Animale, Düsseldorf	Allgemein

<b>Kits</b>		<u>verwendet für:</u>
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche Diagnostics, Mannheim	RT-PCR (FSME)
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing	Qiagen, Hilden	Sequenzierung
DyeEx™ 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden	Sequenzierung
LightCycler® DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics, Mannheim	PCR
One Shot® Kit	Invitrogen, Karlsruhe	Klonierung
PCR II TOPO TA Cloning Kit ®	Invitrogen, Karlsruhe	Klonierung
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden	Nukleinsäureextraktion
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	Sequenzierung
Reagenzkartuschen Maxwell®16 Tissue DNA Purification Kit, AS1030	Promega, Mannheim	Nukleinsäureextraktion
<b>Serologische Untersuchung</b>		
Immunozytm® FSME (TBE) IgG All species	Progen Biotechnik, Heidelberg	ELISA (FSME)
NovaLisa™ <i>Borrelia burgdorferi</i> IgG-ELISA recombinant	NovaTec Immundiagnostica, Dietzenbach	ELISA ( <i>Borrelia</i> )
Protein G, Peroxidase Conjugate, 539322	Calbiochem/Merck, Darmstadt	ELISA/Immunblot
recomLine <i>Borrelia</i> IgG Streifen-Immunoassay	Mikrogen, Neuried	Immunblot ( <i>Borrelia</i> )
<b>Verbrauchsmaterial</b>		
Biopsiestanze, Biopsy Punch® 3 mm	Kruuse, Langeskov, Dänemark	Allgemein
DURAN® Glasflaschen mit Deckel	Schott, Jena	Allgemein
Einmalkanülen (grün Ø 0,80 mm x L 25 mm)	Terumo, Frankfurt a. M.	Blutabnahme
Einmalpipettenspitzen, gestopft	Biozym, Hessisch Oldendorf	Allgemein
Einmalpipettenspitzen, ungestopft	Eppendorf, Hamburg	Allgemein
Falcons (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg	Allgemein
Glaskapillaren, LightCycler® Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim	PCR
Impfösen	Nunc, Wiesbaden	Nukleinsäureextraktion
Kapillaren für Sequenzierer	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung

		<u>verwendet für:</u>
Kunststoffreaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg	Allgemein
Latex-Handschuhe	Asid Bonz, Herrenberg	Allgemein
Multivette® für die EDTA/Serum-Gewinnung	Sarstedt, Nümbrecht	Blutabnahme
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf	PCR
Schraubdeckelgefäße (1,5 ml)	Biozym, Hessisch Oldendorf	Allgemein
Sequenziergefäße und Septa	Applied Biosystems, Weiterstadt	Sequenzierung
Stauschlauch (Venenstauer für Kleintiere)	Heiland VET, Hamburg)	Blutabnahme
Zellstofftupfer	Henry Schein, Melville, USA	Blutabnahme

### 3.5.2 Lösungen und Puffer

#### 3.5.2.1 Lösungen und Puffer für die Nukleinsäureextraktion

Alle Lösungen und Puffer wurden zur Inaktivierung von RNAsen mit nukleasefreiem Wasser oder Diethylpyrocarbonat (DEP) angesetzt. Glasgefäße für die Herstellung von Lösungen und für die Aufbewahrung von Reaktionsgefäßen wurden 4 h bei 200 °C heißluftsterilisiert. Kunststoffmaterialien wurden nukleasefrei gekauft.

##### DEP-Wasser

- 10 % ige DEP-Stammlösung in absolutem Ethanol herstellen (100 ml DEP + 900 ml Ethanol) und in brauner Glasflasche bei Raumtemperatur lagern
- 0,1 % ige Gebrauchslösung: 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnen (10 ml DEP-Stammlösung + 990 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>)
- Gebrauchslösung für 2 h bei 37 °C inkubieren und anschließend autoklavieren; Lagerung der DEP-Gebrauchslösung bei 4 °C in einem Glasgefäß

Die Kunststoffschraubdeckel zur Aufbewahrung der DEP-Lösungen wurden für 2 h bei 37 °C in die DEP-Gebrauchslösung eingelegt und anschließend autoklaviert (30 min bei 120 °C). Die benutzte DEP-Lösung wurde autoklaviert und zerfällt dadurch in ungiftige Substanzen.

##### Lyse-Puffer für Gewebepools

120 g Guanidinisothiocyanat (GIT) in 100 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 6,4) bei 56 °C lösen

22 ml 0,2 M EDTA (Na-Salz, pH 8,0) und 2,6 g Triton X-100 dazugeben und in dunkler Glasflasche bei Raumtemperatur lagern.

#### 0,1 M Tris-HCl Lösung (pH 6,4)

12,11 g Tris in 800 ml DEP-Gebrauchslösung lösen und den pH-Wert mit HCl (25 %) auf pH 6,4 einstellen; anschließend mit DEP-Gebrauchslösung auf 1 l auffüllen.

Aufbewahrung in Glasflaschen mit Kunststoffschraubdeckeln (vgl. Aufbewahrung DEP-Gebrauchslösung).

#### 20 % ige Chelex 100 Suspension

Chelex 100 Matrix

H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Chelex 100 Matrix sechsmal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> waschen und zwischen den einzelnen Waschsritten jeweils 10 min bei 14.000 g zentrifugieren. Überstand abnehmen und Pellet ad 20 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendieren.

### **3.5.2.2 Lösungen und Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese**

#### Tris-Borat EDTA (TBE)-Puffer (5 x)

53,9 g Tris

27,5 g Borsäure

20 ml EDTA

In H<sub>2</sub>O lösen und auffüllen ad 1l.

#### Ethidiumbromidlösung

Stammlösung (1 %) zu einer 0,1 % igen Gebrauchslösung 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnen.

#### Ladepuffer

20 % Ficoll

0,25 % Bromphenolblau

Auffüllen mit H<sub>2</sub>O ad 20 ml.

#### 100 bp Ladder

Stammlösung 1:8 mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O verdünnen.

### 3.6 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme MS Excel 2003 (Microsoft®) und PASW Statistics 17 (SPSS Inc®) der Firma IBM für MS Windows verwendet.

Vor der Durchführung der statistischen Tests wurden alle Daten auf eine Normalverteilung überprüft. Bei Daten, die keine Normalverteilung aufwiesen, kamen nicht-parametrische Tests (Mann-Whitney U-Test oder Kruskal-Wallis Test) zum Einsatz, bei normalverteilten Daten parametrische Tests (T-Test, ANOVA).

Um Erreger-Prävalenzen in Wirtstieren zu vergleichen, wurden Kontingenztabelle erstellt und mit einem Chi-Quadrat ( $X^2$ )-Test auf signifikante Unterschiede überprüft. Bei einem Vergleich von nur 2 Gruppen wurde der Fisher's Exakt Test verwendet. Für die statistische Untersuchung der Reaktivitäten der Immunblots wurden aufgrund der starken Varianz alle Daten logarithmiert ( $\log_{10} x+1$ ) und mittels einer ANOVA überprüft. Bei allen statistischen Tests wurden p-Werte mit  $\alpha \leq 0,05$  als signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Pathogene im Wirtstier Igel

#### 4.1.1 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

##### 4.1.1.1 Molekularbiologischer Nachweis

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt 285 Sektionsigel (136 weiblich; 149 männlich) aus West- und Mitteleuropa molekularbiologisch auf eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* s. l. untersucht (Tabelle 6). In Deutschland und Großbritannien handelte es sich ausschließlich um die Igelart *Erinaceus europaeus*. Tschechien bildet eine Überlappungszone von *E. europaeus* und *E. roumanicus*, in der beide Arten (*E. europaeus* n=16; *E. roumanicus* n=6) auftraten. Letztere Art wurde auch im östlichen Teil von Österreich gefunden (n=4). Die 10 Tiere aus der Türkei wurden der Art *E. concolor* zugeordnet.

Tabelle 6: Gesamtzahl der auf *Borrelia burgdorferi* s.l. getesteten Igel [n], Anzahl infizierter Igel [n\*] und Infektionsrate [%] aufgeteilt nach Herkunftgebieten, Igelspezies und Jahr.

	2005			2006			2007			2008			Gesamt		
	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]
<b><i>E. europaeus</i></b>															
Oberrhein-Gebiet	2	0	0,0	13	2	15,4	1	0	0,0	8	3	37,5	24	5	20,8
Rhein-Main-Gebiet				23	5	21,7	29	2	6,9	2	1	50,0	54	8	14,8
Hamburg	6	1	16,7	7	1	14,3	12	1	8,3	16	1	6,3	41	4	9,8
Berlin				19	2	10,5							19	2	10,5
München										24	3	12,5	24	3	12,5
Bodensee				6	2	33,3							6	2	33,3
Niedersachsen				4	0	0,0	2	0	0,0				6	0	0,0
„Igelgarten“ Karlsruhe	1	0	0,0	19	4	21,1	5	0	0,0	18	1	5,6	43	5	11,6
Großbritannien				18	0	0,0				14	0	0,0	32	0	0,0
Tschechien										16	6		16	6	37,5
gesamt	9	1	11,1	109	16	14,7	49	3	6,1	98	15	15,3	265	35	13,2
<b><i>E. roumanicus</i></b>															
Tschechien										6	0	0,0	6	0	0,0
Österreich	4	2	50,0										4	2	50,0
gesamt	4	2	50,0							6	0	0,0	10	2	20,0
<b><i>E. concolor</i></b>															
Türkei				10	0	0,0							10	0	0,0
gesamt				10	0								10	0	0,0
<b><i>Erinaceus</i> spp. gesamt</b>	13	3	23,1	119	16	13,4	49	3	6,1	104	15	14,4	285	37	13,0

Für das Screening eines Igels auf eine Borrelien-Infektion wurde die DNA-Extraktion seines Organpools verwendet und in der 5S23S rDNA-PCR getestet. Insgesamt enthielten 37 von 285 Organpools (13,0 %) *B. burgdorferi* s.l.-DNA (Tabelle 6). In 35 von 265 Tieren der Art *E. europaeus* wurde der Erreger in den Organen nachgewiesen. 2 von 4 Igel (*E. roumanicus*) aus Österreich waren mit Borrelien infiziert. In keinem Igel der Gattung *E. concolor* aus der Türkei wurden Borrelien detektiert. Positive Organpools wurden zusätzlich mittels OspA-PCR überprüft. Bis auf 2 konnten alle 37 Proben bestätigt werden.

Für die statistische Analyse wurden die Jahre aufgrund der geringen Stichprobengrößen für jeden Herkunftsort zusammengefasst. Es zeigten sich keine statistischen Unterschiede hinsichtlich der *Borrelia*-Prävalenz in *E. europaeus* zwischen den 9 Untersuchungsgebieten auf dem Festland; allerdings wich Großbritannien signifikant davon ab ( $X^2=5,54$ ;  $p=0,019$ ). Dort waren alle 32 untersuchten Tiere *Borrelia*-negativ. Männliche und weibliche Igel waren gleich häufig mit Borrelien infiziert.

Bei der Sektion wurden juvenile, subadulte und adulte Igel in 3 Gewichtskategorien eingeteilt (Tabelle 7). Alle 3 Alterskategorien waren in Gewichtsklasse 1 vertreten. Erwartungsgemäß gab es die meisten juvenilen und subadulten Igel in dieser Gruppe. Aber auch 13 adulte Tiere mit einem schlechten Allgemeinzustand wurden in diese Gruppe eingeteilt. In Gewichtskategorie 2 und 3 wurden vorwiegend adulte Tiere eingruppiert. Die meisten *Borrelia*-infizierten Tiere konnten in den ersten beiden Gewichtsklassen gefunden werden. Lediglich 3 infizierte Tiere wogen über 800 g.

Der kleinste Igel, der mit Borrelien infiziert war, wog 130 g, was einem ungefähren Alter von 4 bis 6 Wochen entspricht.

Tabelle 7: Übersicht der untersuchten Sektionsigel, eingeteilt in die verschiedenen Alterskategorien (juvenil, subadult und adult) in Abhängigkeit ihres Gewichtes. Die *Borrelia*-infizierten Gruppen sind fett dargestellt.

Igelart	Alterskategorie	Gewichtsgruppe 1 (100-500 g)	Gewichtsgruppe 2 (501-799 g)	Gewichtsgruppe 3 ( > 800 g)
		n infiziert/ n untersucht ( %)	n infiziert/ n untersucht ( %)	n infiziert/ n untersucht ( %)
<b><u>E. europaeus</u></b>				
Festland	juvenil	<b>11/55 (20,0 %)</b>	0/2 (0,0 %)	0
	subadult	<b>5/24 (20,8 %)</b>	<b>4/11 (36,4 %)</b>	0/1 (0,0 %)
	adult	<b>3/13 (23,1 %)</b>	<b>9/86 (10,5 %)</b>	<b>3/41 (7,3 %)</b>
Großbritannien	juvenil	0/11 (0,0 %)	0	0
	subadult	0/4 (0,0 %)	0/4 (0,0 %)	0
	adult	0/1 (0,0 %)	0/6 (0,0 %)	0/6 (0,0 %)
<b><u>E. roumanicus</u></b>				
	juvenil	<b>2/8 (25,0 %)</b>	0	0
	subadult	0	0	0
	adult	0	0/1 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)
<b><u>E. concolor</u></b>				
	juvenil	0/6 (0,0 %)	0	0
	subadult	0	0	0
	adult	0	0/1 (0,0 %)	0/3 (0,0 %)

Zu allen Jahreszeiten (Frühling, Sommer, Herbst und Winter) konnten *Borrelia*-infizierte Tiere gefunden werden (Abbildung 21); vor allem in den Herbstmonaten wurde fortlaufend von 2005 bis 2008 *B. burgdorferi* s.l.-DNA in den Organen detektiert. Auch in der „zeckenfreien“ Winterzeit (Jahr 2006) waren Borrelieninfektionen in 2 Tieren nachweisbar. Bezüglich der *Borrelia*-Prävalenz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Jahreszeiten ermittelt werden. Die meisten Sektionsigel stammten aus dem Monat September, einem Monat, in dem die Säuglings- und Jungigel-Sterblichkeit am höchsten ist. Folglich wurden im Herbst viele Igel auf Borrelien untersucht und dementsprechend viele infizierte zu dieser Jahreszeit gefunden (Abbildung 21).

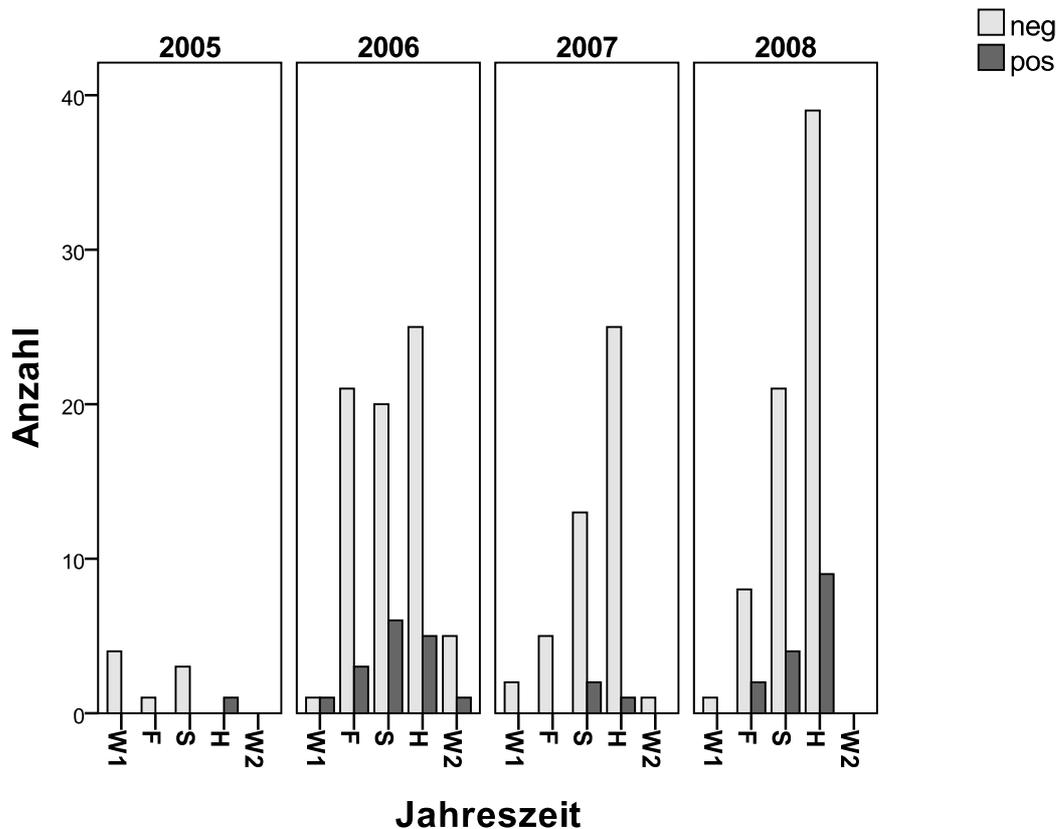


Abbildung 21: Jahreszeitliche Verteilung der *Borrelia*-infizierten (dunkelgrau) und nicht infizierten (hellgrau) *Erinaceus europaeus* auf dem Festland zu verschiedenen Jahreszeiten (n=230). W1=Winter (Januar, Februar), F=Frühling (März, April, Mai), S=Sommer (Juni, Juli, August), H=Herbst (September, Oktober, November), W2=Winter (Dezember).

#### 4.1.1.2 *Borrelia burgdorferi* s.l. Artdifferenzierung

Bei positiven Organpools wurden die inneren Organe (Herz, Lunge, Leber, Milz, Niere, Blase) eines Tieres einzeln in der OspA-PCR und vereinzelt in der 5S23S rDNA-PCR getestet. Lediglich im Herz-, Nieren- und Blasengewebe wurde *B. burgdorferi* s.l.-DNA detektiert.

Bei der OspA-PCR konnte unmittelbar nach dem PCR-Lauf eine Zuordnung bis zur jeweiligen Genospezies mittels Schmelzpunktanalyse vorgenommen werden. Zusätzlich konnte die Bildung der PCR-Produkte direkt am PC verfolgt werden. Dabei steigt die Fluoreszenz proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produktes an. Der ct-Wert gibt in diesem Zusammenhang den Schwellenwert an, ab dem die Fluoreszenz der Probe aus dem

Hintergrund trat. In Abbildung 22 ist ein durchgeführter LightCycler-Lauf mit Igelorganproben exemplarisch abgebildet. Mithilfe der nachfolgenden Schmelzpunktanalyse ließ sich sofort auf die jeweilige Genospezies schließen, da die Amplifikate je nach Art unterschiedliche Schmelzpunkte aufweisen (Abbildung 23, Angaben zu den Temperaturmaxima unter 3.4.3.2, Tabelle 5). Die DNA von *B. afzelii* war oft in sehr großer Menge in den positiven Proben vorhanden, was sich durch niedrige ct-Werte (Abbildung 22) und hohe Fluoreszenzmaxima bei der Schmelzpunktanalyse bemerkbar machte (Abbildung 23). Bei 17 Igeln lag eine Einfachinfektion mit dieser Genospezies vor, bei 7 eine Mischinfektion bestehend aus *B. afzelii* und *B. bavariensis*, bei 2 Igeln eine Mischinfektion aus *B. afzelii* und *B. spielmanii* und bei einem Tier sogar eine Dreifachinfektion (*B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*). Eine Übersicht der Mischinfektionen aller Igel ist im Anhang (Tabelle 30) aufgeführt.

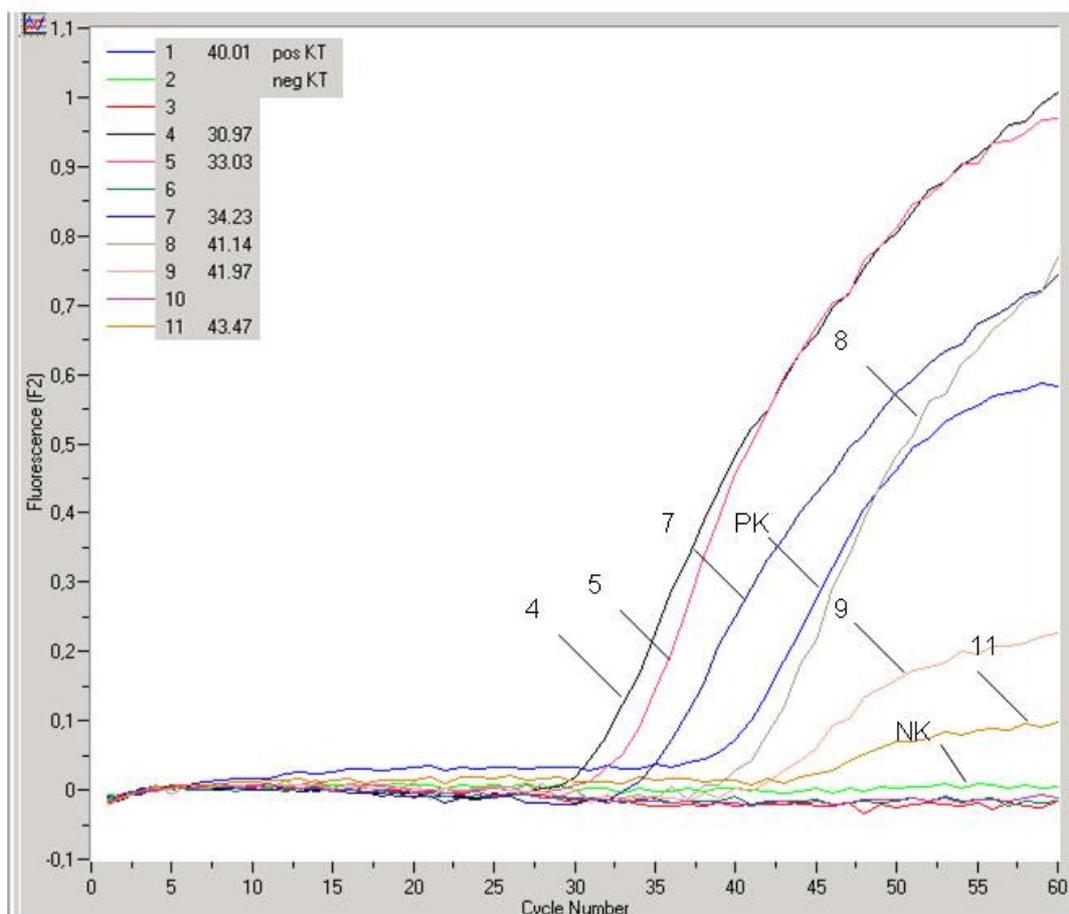


Abbildung 22: Nachweis von *Borrelia burgdorferi* s.l. Exemplarische OspA-PCR von Igelorganpools mittels LightCycler. Die positiven Proben sind mit Nummern gekennzeichnet. PK=Positivkontrolle (*B. burgdorferi* s.s), NK=Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O). Probe 4, 5, 7, 8=*B. afzelii*; Probe 9=*B. bavariensis*; Probe 11=*B. spielmanii*. Die Dezimalzahlen oben links geben die ct-Werte an.

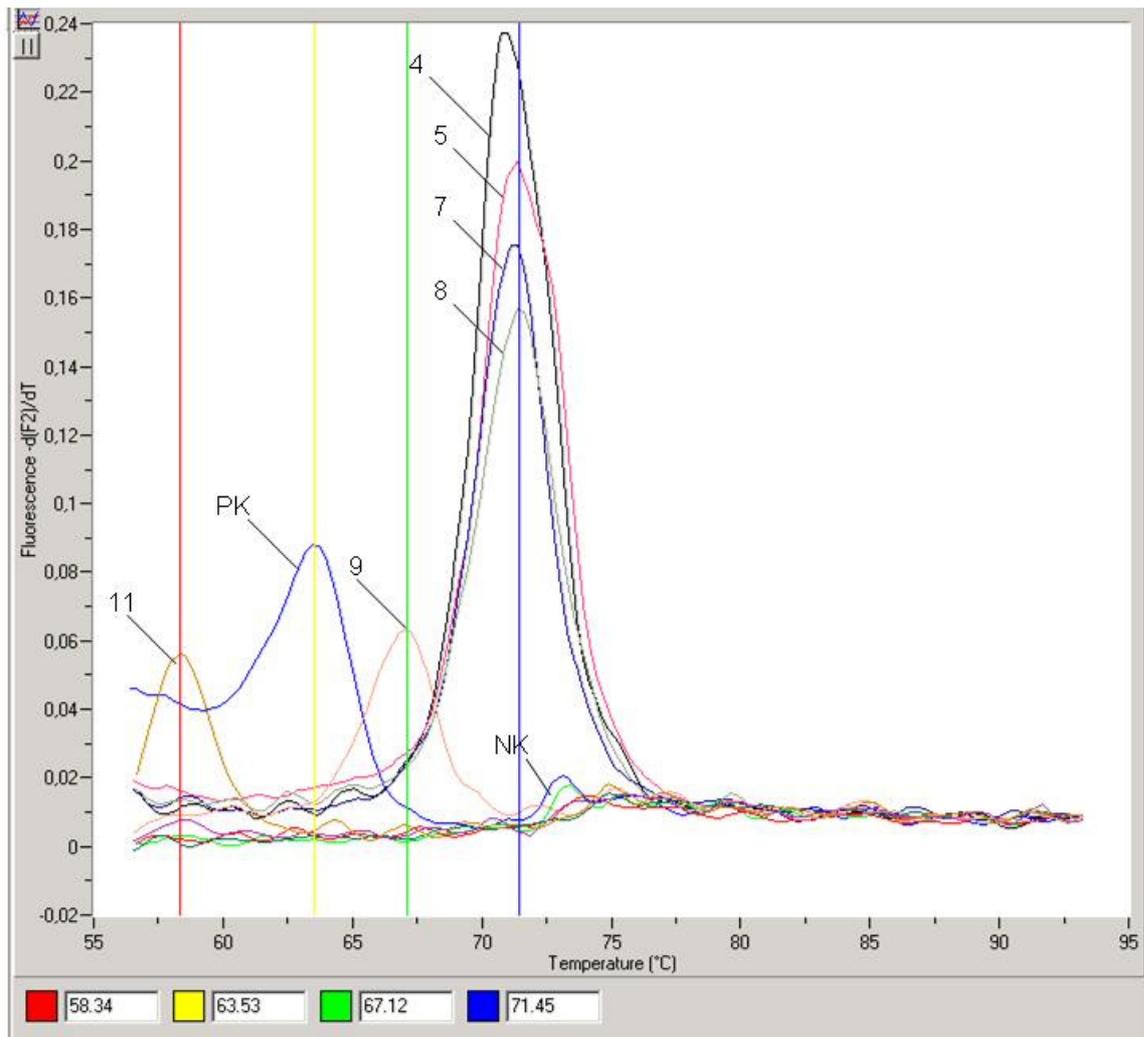


Abbildung 23: Die nachfolgende Schmelzpunktanalyse der Proben aus Abbildung 22 zeigt einen Peak der Positivkontrolle (*B. burgdorferi* s.s.) bei ~63-64 °C sowie das Vorhandensein von *B. afzelii* (Schmelzpunktmaxima bei ~71-72 °C) in den Proben 4, 5, 7 und 8 *B. garinii* (bzw. *B. bavariensis*) bei ~67-68 °C in Probe 9 und *B. spielmanii* bei ~58-59 °C in Probe 11.

Die PCR-Produkte der Organpools beider PCR-Systeme wurden zusätzlich sequenziert, wobei die Elektropherogramme der OspA-PCR deutlich besser abzulesen waren. Aufgrund starker Überlagerungen gestaltete sich die Auswertung der 5S-23S rDNA-Fragmente oft schwierig oder war in vielen Fällen nicht möglich. Die korrigierten, sehr kurzen Sequenzabschnitte (maximal 178 bp) waren zu nahezu 100 % (98 %-100 %) identisch mit *B. afzelii* (Acc. No. CP000395), *B. bavariensis* (Acc. No. CP000013) und *B. spielmanii* (Acc. No. AF497994) auf GenBank.

Die beiden 5S-23S rDNA-Isolate, die in der OspA-PCR nicht detektierbar waren, erwiesen sich in der Sequenzierung als *B. spielmanii*. Bei 2 Individuen aus dem „Igelgarten“ ergab die

5S23S rDNA-PCR (eines Organpools bzw. einer Niere) ein Produkt, das nicht sequenziert werden konnte.

Aufgrund der schlechten 5S-23S rDNA-Sequenzen wurden im folgenden Verlauf der Studie die einzelnen Organe der infizierten Tiere nur noch auf dem LightCycler auf eine Infektion überprüft und diese Amplifikate sequenziert. Der Vergleich der ca. 250 bp langen Isolate mittels BLAST zeigte eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung (98 %-99 %) mit den auf GenBank hinterlegten Sequenzen von *B. afzelii* (Acc. No. X85982), *B. bavariensis* (Acc. No. X80257) und *B. spielmanii* (Acc. No. CP001469). Auffällig beim Vergleich mit den vorhandenen GenBank Sequenzen war, dass alle *B. afzelii* Isolate an der gleichen Stelle einen Basenaustausch aufwiesen (Abbildung 24). Einzelne Basenunterschiede bei Isolaten von *B. bavariensis* und *B. spielmanii* waren dagegen unterschiedlich lokalisiert.

```

Score=470 bits (254), Expect=3e-129
Identities=256/257 (99%), Gaps=0/257 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      AATAGCATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGATGAAAAAACAGCGCTTCAGTAGATT 60
          |||
Sbjct 42      AATAGCATGTAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGATGAAAAAACAGCGCTTCAGTAGATT 101

Query 61     GCCTGGTGAGATGAAAGTTCTTGTAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACGGTAAAGTACAGTCT 120
          |||
Sbjct 102     GCCTGGTGAGATGAAAGTTCTTGTAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACGGCAAGTACAGTCT 161

Query 121    AAAGGCAACAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACTTCTGATAAAGACAATGGTTCTGG 180
          |||
Sbjct 162    AAAGGCAACAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACTTCTGATAAAGACAATGGTTCTGG 221

Query 181    GGTGCTTGAAGGTACAAAAGATGACAAAAGTAAAGCAAATTAACAATTGCTGACGATCT 240
          |||
Sbjct 222    GGTGCTTGAAGGTACAAAAGATGACAAAAGTAAAGCAAATTAACAATTGCTGACGATCT 281

Query 241    AAGTAAAACCACATTCG 257
          |||
Sbjct 282    AAGTAAAACCACATTCG 298

```

Abbildung 24: 99 % Sequenzübereinstimmung eines *Borrelia afzelii*-Isolats aus einem Igelorganpool (Query) mit einer auf GenBank hinterlegten OspA-Sequenz von *B. afzelii* (Sbjct, Acc. No. X85982). Der grau unterlegte Bereich markiert den Basenunterschied.

#### 4.1.1.2.1 Verteilung der Genospezies

##### a) in den Organen

Nur im Blasen-, Herz- und Nierengewebe der zuvor positiv getesteten 37 Tiere konnte *B. burgdorferi* s.l.-DNA nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Blase als Einzelorgan am besten für den Nachweis von Borrelien geeignet ist. Lediglich bei 11 von 37 Tieren (29,73 %), deren Organpool als positiv eingestuft wurde, gelang der DNA-Nachweis aus der Blase nicht. Dagegen konnten in 19 (51,35 %) bzw. 22 Igeln (59,46 %) keine *Borrelia*-DNA im Nieren- bzw. Herzgewebe detektiert werden. In den einzelnen Organen war die Verteilung der Genospezies unterschiedlich (Abbildung 25 bis Abbildung 27). Während *B. afzelii* in allen 3 Organsystemen dominierte, war *B. spielmanii* in der Niere bzw. *B. bavariensis* primär im Herzgewebe lokalisiert. Allerdings ergab der Chi-Quadrat Test, dass diese vermeintliche Organpräferenz der einzelnen Genospezies nicht signifikant war.

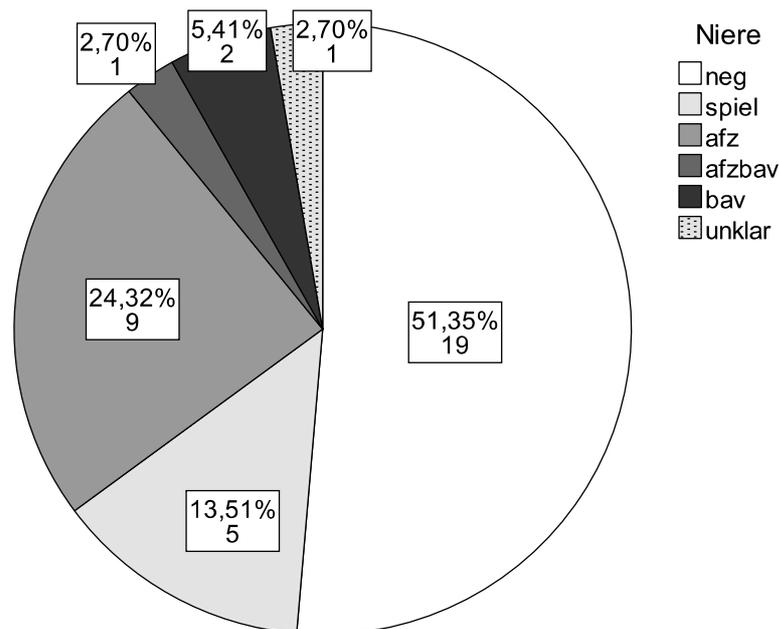


Abbildung 25: Prozentuale Verteilung der *Borrelia*-Genospezies in der Niere der positiv getesteten Igel (n=37). Neg=negativ, afz=*B. afzelii*, bav=*B. bavariensis*, spiel=*B. spielmanii*, afzbav=Mischinfektion mit *B. afzelii* und *B. bavariensis*, unklar=Genospezies nicht zu identifizieren.

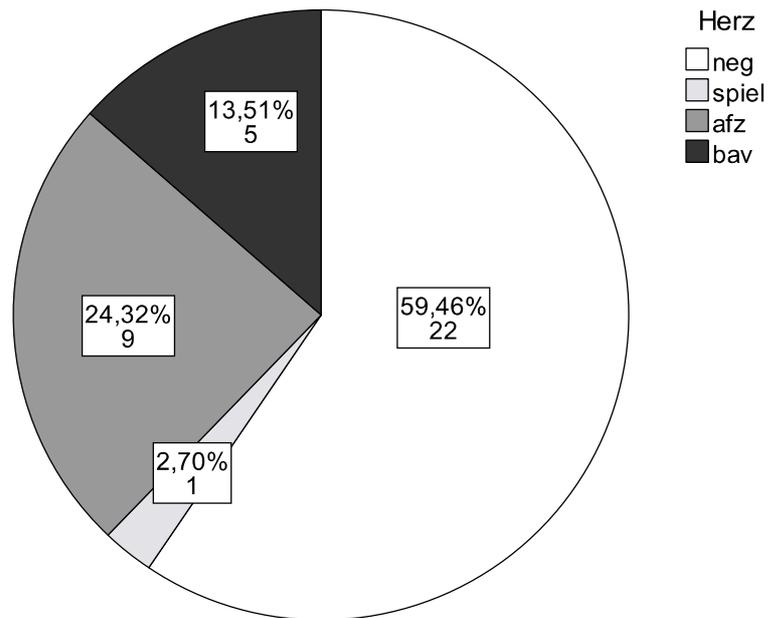


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung der *Borrelia*-Genospezies im Herz der positiv getesteten Igel (n=37).  
Neg=negativ, afz=*B. afzelii*, bav=*B. bavariensis*, spiel=*B. spielmanii*.

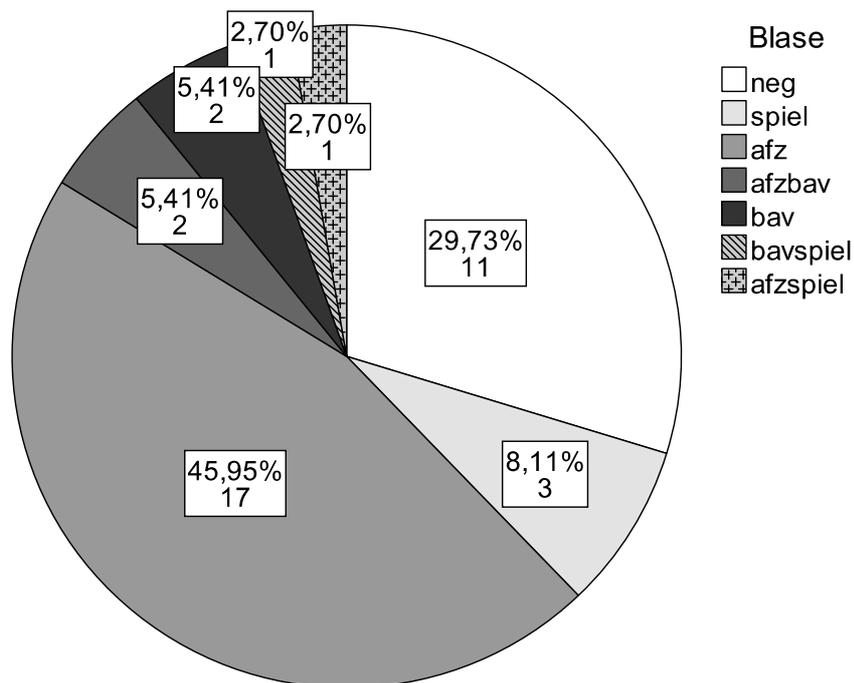


Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der *Borrelia*-Genospezies in der Blase der positiv getesteten Igel (n=37)  
Neg=negativ, afz=*B. afzelii*, bav=*B. bavariensis*, spiel=*B. spielmanii*, afzbav=Mischinfektion mit *B. afzelii* und *B. bavariensis*, afzspiel=Mischinfektion mit *B. afzelii* und *B. spielmanii*, bavspiel=Mischinfektion mit *B. bavariensis* und *B. spielmanii*.

## b) nach Herkunft

Tabelle 8 listet die Verteilung der Genospezies der infizierten Igel aufgeschlüsselt nach Herkunftsort, Einzel- und Mischinfektionen auf. *B. afzelii* wurde als dominierende Genospezies in allen Untersuchungsgebieten gefunden.

8 der *Borrelia*-infizierten Tiere stammten aus Hessen, wovon 5 Tiere sogar eine Doppel- oder Dreifachinfektion mit *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii* aufwiesen (Tabelle 8). *B. bavariensis* konnte ebenfalls als Einzel- oder Mischinfektion in jedem Untersuchungsgebiet, bis auf München, gefunden werden. Erstmals gelang es, *B. spielmanii* in Hamburg nachzuweisen. Bei 2 Tieren wurde *B. spielmanii* als Einzelinfektion, bzw. als Mischinfektion mit *B. bavariensis* detektiert. Abgesehen von Hamburg trat *B. spielmanii* nur noch in Hessen und Baden-Württemberg auf.

Nicht nur Tiere der Art *E. europaeus*, sondern auch 2 Igel der Art *E. roumanicus* aus Österreich waren jeweils mit *B. afzelii* bzw. *B. bavariensis* infiziert (Tabelle 8).

Die Stichprobengröße der gefundenen Genospezies in den einzelnen Herkunftsgemeinden war allerdings zu gering, um signifikante Unterschiede bezüglich der geografischen Verbreitung der einzelnen *Borrelia*-Genospezies zu ermitteln.

Tabelle 8: Übersicht der Einzel- und Mischinfektionen mit *Borrelia afzelii* (afz), *B. bavariensis* (bav) und *B. spielmanii* (spiel) in positiv getesteten Igel (Erinaceus europaeus), aufgeschlüsselt nach Herkunft. \* in Österreich: *E. roumanicus*. Unklar=Genospezies nicht zu identifizieren.

Herkunft	Einzelinfektionen			Mischinfektionen				unklar	gesamt
	afz	bav	spiel	afz+bav	afz+spiel	bav+spiel	afz+bav+spiel		
Oberrhein-Gebiet	2	0	1	1	1	0	0	0	5
Hamburg	2	0	1	0	0	1	0	0	4
Berlin	1	0	0	1	0	0	0	0	2
Igelgarten	0	1	1	1	0	0	0	2	5
Rhein-Main-Gebiet	3	0	0	2	1	1	1	0	8
Bodensee	1	1	0	0	0	0	0	0	2
München	3	0	0	0	0	0	0	0	3
Tschechien	4	0	0	2	0	0	0	0	6
Österreich*	1	1	0	0	0	0	0	0	2
gesamt	17	3	3	7	2	2	1	2	37

### c) nach Jahreszeit

Bis auf Februar und März konnten Borrelien in jedem Monat aus den Organen isoliert werden (Tabelle 9). Im Januar wurde ein Igel in der 5S23S rDNA-PCR als *Borrelia* positiv getestet, die Genospezies konnte aber bei der Sequenzierung nicht ermittelt werden. Von April bis Dezember konnten durchgängig infizierte Tiere gefunden werden. Wiederum war die Stichprobengröße zu gering, um signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung von verschiedenen Genospezies herauszuarbeiten.

Tabelle 9: Übersicht der Einzel-/Mischinfektionen von positiv getesteten Igeln aufgeteilt nach Monaten.

Afz=*B. afzelii*, bav=*B. bavariensis*, spiel=*B. spielmanii*, unklar=Genospezies nicht zu identifizieren.

Monat	<i>Borrelia</i> -Genospezies								gesamt
	afz	bav	spiel	afz+bav	afz+spiel	bav+spiel	afz+bav+spiel	unklar	
Januar	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Februar	0	0	0	0	0	0	0	0	0
März	0	0	0	0	0	0	0	0	0
April	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Mai	2	0	0	1	1	0	0	0	4
Juni	2	0	0	0	0	0	0	0	2
Juli	1	1	2	1	0	0	0	0	5
August	0	0	1	1	1	0	1	1	5
September	7	0	0	3	0	0	0	0	10
Oktober	2	1	0	0	0	1	0	0	4
November	3	0	0	1	0	0	0	0	4
Dezember	0	0	0	0	0	1	0	0	1
gesamt	17	3	3	7	2	2	1	2	37

#### 4.1.1.3 Serologischer Nachweis

##### 4.1.1.3.1 Serologisches Screening (ELISA)

Insgesamt 161 Igelseren aus 4 verschiedenen Kollektiven (Großraum Frankfurt, Hessen; Großraum Karlsruhe, Baden-Württemberg; Großraum Hamburg, Hamburg und dem „Igelgarten“, Baden-Württemberg) wurden auf das Vorhandensein von spezifischen *Borrelia burgdorferi* s.l. Antikörpern überprüft (Tabelle 10).

Die OD-Werte der Kit-Kontrollen in Kombination mit dem adaptierten Protein G-Peroxidase-Konjugat lagen im vom Hersteller angegebenen Referenzbereich (Negativkontrolle: OD=niedriger als 0,200; Cut-Off Kontrolle: OD=zwischen 0,250 und 0,900; Positivkontrolle=größer 0,900). Als positiv wurden Tiere gewertet, deren Extinktionswert über einer OD von 1,0 lag (grenzwertige Tiere OD: 0,65-0,95; negative Tiere: OD < 0,5).

In den Igelstationen in Hessen und Baden-Württemberg reagierte ungefähr die Hälfte der

gesteten Seren positiv im ELISA, in Hamburg ca. 60 %. Dagegen wiesen alle getesteten Tiere aus dem „Igelgarten“ spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. im Blut auf (Tabelle 10). Da es sich um adulte Tiere handelte, die alle älter als 1 Jahr waren und das ganze Jahr hinweg zeckenexponiert lebten, gab es hoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Antikörperprävalenz zwischen dem „Igelgarten“ und den anderen Herkunftsorten ( $X_6^2=39,13$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabelle 10: Ergebnisse der ELISA-Untersuchung von Igelseren aus 4 Kollektiven (Frankfurt n=34, Karlsruhe n=27, Hamburg n=54, „Igelgarten“ n=46).

		Herkunft				gesamt
		Großraum Frankfurt	Großraum Karlsruhe	Großraum Hamburg	Igelgarten	
Bewertung ELISA	negativ	17	13	19	0	49
	positiv	14	12	33	46	105
	grenzwertig	3	2	2	0	7
gesamt		34	27	54	46	161

#### 4.1.1.3.2 Bestätigungstest (Immunblot)

Bei 112 Igelseren mit grenzwertigem (n=7) oder positivem (n=105) ELISA-Befund, erfolgte eine Verifizierung der ELISA-Ergebnisse mithilfe eines kommerziellen Immunblots, der mit verschiedenen rekombinant hergestellten Antigenen beschichtet war. Zusätzlich wurden 3 negativ getestete Seren eingesetzt, um falsch negative Proben im ELISA auszuschließen. Insgesamt kamen somit 115 Igelseren im Immunblot zum Einsatz.

Abbildung 28 zeigt exemplarisch die Reaktivitäten zweier Igelseren gegen einzelne *Borrelia*-Antigene. Die Ergebnisse aller Igelseren sind im Anhang (Tabelle 28; Abbildung 38-Abbildung 43) aufgeführt.

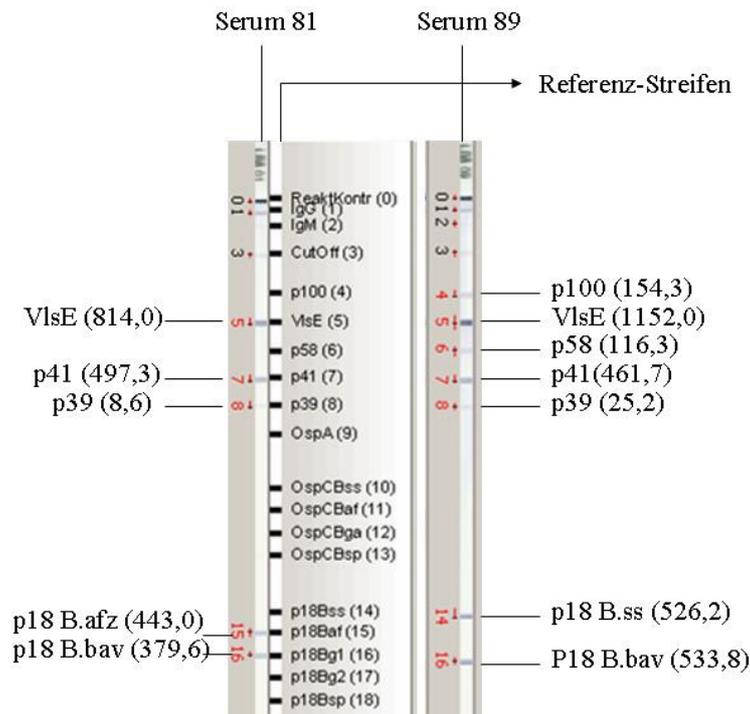


Abbildung 28: Exemplarischer Immunblot von Serum 81 und Serum 89. Der Referenzstreifen zeigt die Reaktionskontrolle, den Cut-Off sowie die jeweiligen Positionen der *Borrelia*-Antigene. Gegen die rot unterlegten Antigene waren Reaktivitäten (Extinktionswerte in Klammern) erkennbar.

### a) 2-Banden-Kriterium

Nach dem Qualitätsstandard in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik sind menschliche Seren im Immunblot erst dann positiv zu bewerten, wenn Banden gegen mindestens 2 hochspezifische Proteine nachgewiesen werden (2-Banden-Kriterium, MiQ-Richtlinie, Wilske et al. 2000).

71 von 105 (67,6 %) der im ELISA positiv getesteten Proben konnten auch im Immunblot eindeutig als positiv gewertet werden (Tabelle 11). 2 weitere Proben sind nach der MiQ-Richtlinie als fraglich einzustufen, da nur das Kriterium einer hochspezifischen Bande erfüllt wurde. Lediglich 1 von 7 im ELISA als grenzwertig beurteilten Proben erwies sich im Immunblot als positiv. Bei 32 Proben konnte das positive ELISA-Ergebnis nicht gestützt werden, obwohl Reaktivitäten gegen mehrere, weniger spezifische Proteine sichtbar waren.

Bei den 3 Proben mit negativem ELISA-Befund waren auch im Immunblot keine Banden sichtbar (Tabelle 11). Insgesamt konnten somit 72 der 112 (64,3 %) im ELISA als grenzwertig bzw. positiv getesteten Seren nach dem 2-Banden Kriterium bestätigt werden.

Tabelle 11: Übersicht der getesteten Igelseren, aufgliedert nach Ergebnis im ELISA und anschließender Verifizierung im Immunblot nach dem 2-Banden-Kriterium (MiQ-Richtlinie).

		Ergebnisinterpretation Immunblot			gesamt
		fraglich	negativ	positiv	
Bewertung ELISA	negativ	0	3	0	3
	positiv	2	32	71	105
	grenzwertig	0	6	1	7
gesamt		2	41	72	115

#### b) Reaktivität gegen mindestens 1 Bande und 1 Punkt in der Wertetabelle

Aufgrund der Adaption des „all species“-Konjugates an einen kommerziellen Immunblot aus der Humanmedizin und der Verwendung tierischer Seren, wurde die Ergebnisinterpretation des Immunblots bei Igelseren nach einer weniger strengen Richtlinie vorgenommen. Tabelle 12 zeigt die Anzahl positiver und negativer Seren, wenn man von einer hochspezifischen bzw. mehreren weniger spezifischen Banden im positiven Wertebereich ausgeht, und diese in der von der Software erstellten Punktetabelle (siehe Anhang: Tabelle 28) mit mindestens einem Punkt aufgeführt sind. Basierend auf dieser Grundlage können 92 von 105 Seren (87,6 %) im ELISA positiven Seren bestätigt werden. Bei den im ELISA grenzwertig getesteten Seren sind demnach 3 von 7 als positiv zu bewerten. Insgesamt können also 95 von 112 (84,8 %) der positiv und grenzwertig im ELISA getesteten Seren nach dieser Ergebnisinterpretation im Immunblot bestätigt werden (siehe Anhang: Tabelle 28). Bei 4 Seren ist eine Reaktivität gegen eine Antigenbande sichtbar, allerdings ist diese schwächer als der Cut-Off ausgeprägt und bekommt daher keinen Punkt in der Wertetabelle.

Tabelle 12: Igelseren mit mindestens einer Bande im Immunblot und einem Punkt in der Wertetabelle.

\* kennzeichnet 4 Seren, die zwar eine Reaktivität zeigten, die aber schwächer als der Cut-Off ausgeprägt war.

		mindestens eine Bande im Immunblot sichtbar		
		nein	ja	
Bewertung ELISA	negativ	3	0	3
	positiv	9	92 (+4*)	105
	grenzwertig	4	3	7
gesamt		16	99	115

### c) Reaktivitäten gegen einzelne *Borrelia*-Antigene

Bei 99 Tieren konnten Reaktivitäten gegen mindestens eine Bande des Immunblots detektiert werden. Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Igelseren mit Reaktivitäten gegen die einzelnen *Borrelia*-Antigene. Der verwendete Ausdruck „negativer Wertebereich“ bezieht sich auf Seren, die zwar eine schwache Bande zeigten, die aber schwächer als die Kontrollbande (Cut-Off) ausgeprägt war und somit von der Auswertungssoftware, die für humane Seren ausgelegt ist, mit einem negativen Vorzeichen versehen wurde.

Tabelle 13: Anzahl der reaktiven Igelseren (n=99), aufgeteilt nach Wertebereich und Antigenen. Afz=*Borrelia afzelii*, spiel=*B. spielmanii*, gar=*B. garinii*, ss=*B. burgdorferi* s.s., bav=*B. bavariensis*.

<i>Borrelia</i> -Antigen	Anzahl reaktiver Igelseren			Keine Bande
	im positiven Wertebereich	im negativen Wertebereich	gesamt	
VlsE	73	4	77	22
p100	38	8	46	53
p58	14	11	25	74
p41	30	5	35	64
p39	51	12	63	36
OspA	0	0	0	99
OspC afz	7	5	12	87
OspC spiel	5	5	10	89
OspC gar	4	1	5	94
OspC ss	1	2	3	96
p18 ss	1	1	2	97
p18 afz	31	7	38	61
p18 bav	42	5	47	52
p18 gar	0	1	1	98
p18 spiel	2	2	4	95

Die meisten Igel zeigten eine Reaktivität gegen das VlsE-Antigen. Des Weiteren reagierten Igelseren stark mit p39, p100, p41 und p58. Keines der Igelseren war reaktiv gegen das OspA-Antigen, nur wenige gegen die OspC-Antigene. Die rekombinant hergestellten p18-Antigene des Blotstreifens sind für eine Aussage über das Vorhandensein von IgG-Antikörpern gegen die einzelnen *Borrelia*-Genospezies am aussagekräftigsten, da sie für jede Genospezies hoch spezifisch sind. Fast die Hälfte der Igel (47/99) hatte Antikörper gegen *B. bavariensis*, gefolgt von *B. afzelii* (38/99), *B. spielmanii* (4/99) und *B. burgdorferi* s.s. (2/99) im Blut. Nur 1 Igel zeigte eine schwache Reaktivität gegen *B. garinii* (vogelspezifische *B. garinii*-Art) im negativen Wertebereich. In jedem Untersuchungsgebiet konnten Reaktivitäten gegen VlsE, p100, p41 und p39 nachgewiesen werden (Abbildung 29). Diese Antigene lösten offenbar auch bei den untersuchten juvenilen Igel aus Hessen und Baden-Württemberg eine frühe Immunantwort aus. Reaktivitäten gegen die p18-Antigene wurden vorrangig bei adulten Tieren aus Hamburg und aus dem „Igelgarten“ detektiert.

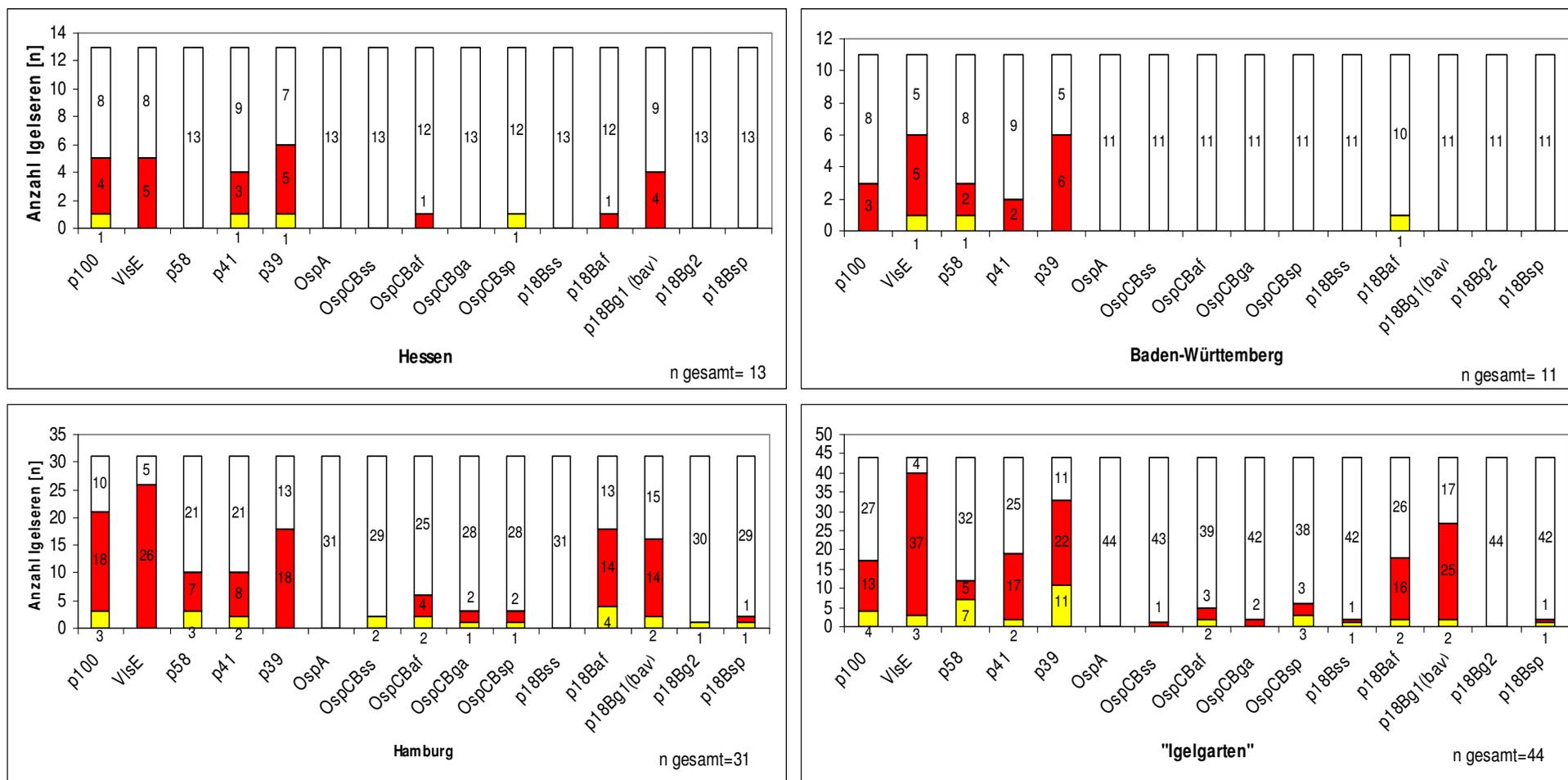


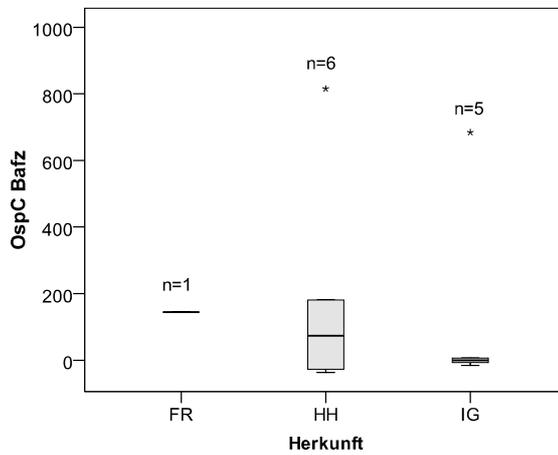
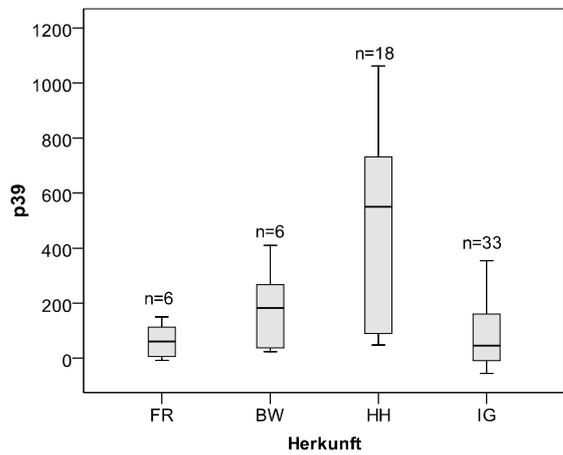
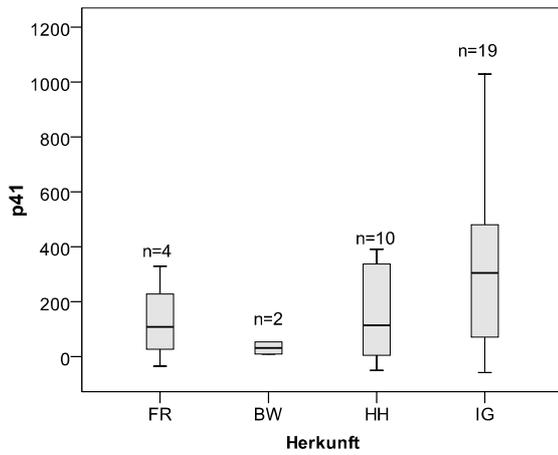
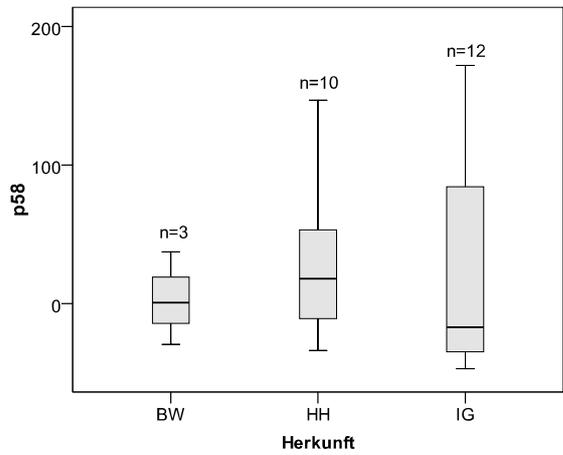
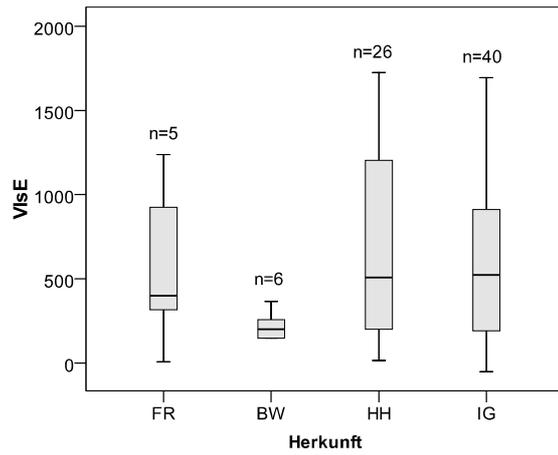
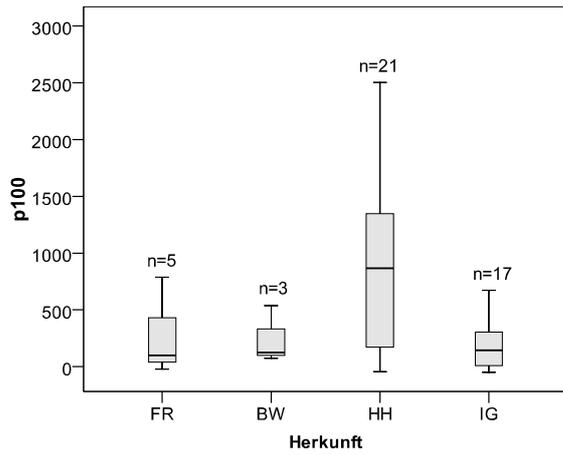
Abbildung 29: Anzahl der untersuchten Igelseren mit Reaktivitäten gegen mindestens eine Antigenbande (n=99). Die rote Säule zeigt die Anzahl der Igelseren mit positiver Reaktivität, die gelbe Säule die mit einer Reaktivität im negativen Wertebereich, und die weiße Säule die Anzahl der Seren ohne eine Reaktivität gegen das jeweilige Antigen.

Die Reaktivitäten der einzelnen Igelseren gegen die jeweiligen Antigene lagen innerhalb eines breit gefächerten Wertebereiches (Tabelle 14). Vor allem p100 und VlsE-Werte unterlagen einer großen Varianz. Bei der statistischen Analyse wurden alle Reaktivitäten logarithmiert ( $\log_{10}+1$ ) und sowohl hinsichtlich der Herkunft als auch des Alters (juvenil, subadult, adult) mittels einer ANOVA untersucht. Bei ausreichender Größe der Stichprobenanzahl konnten in den meisten Fällen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich bei 2 Testvariablen zeigte sich eine Signifikanz: zum einen hatten juvenile Igel erniedrigte VlsE-Reaktivitäten im Vergleich zu adulten Tieren, zum anderen waren die Reaktivitäten gegen das p39 Protein bei Tieren aus Hamburg signifikant im Gegensatz zu den Tieren aus Hessen erhöht. Der Tukey-Test zeigte, dass sowohl adulte und subadulte Tiere als auch juvenile und subadulte Tiere homogene Untergruppen bildeten, sich aber adulte Igel und juvenile Tiere hinsichtlich der VlsE-Reaktivitäten signifikant voneinander unterschieden. Hinsichtlich des p39-Proteins bildeten sowohl Tiere aus Hessen, Baden-Württemberg und dem „Igelgarten“ eine homogene Untergruppe als auch Tiere aus Baden-Württemberg, dem „Igelgarten“ und Hamburg.

Tabelle 14: Anzahl der reaktiven Seren (n), Minimal-, Maximal-, Mittelwerte und Standardabweichung der einzelnen Antigene in Relation zum Cut-Off.

<b>Borrelia-Antigen</b>	<b>n</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
p100	46	-50,10	2502,00	487,13	602,18
VlsE	77	-52,20	1724,00	601,50	485,00
p58	25	-46,90	171,80	24,34	65,53
p41	35	-57,80	1029,00	232,35	249,53
p39	63	-54,80	1062,00	206,02	264,58
OspA	0				
OspCBss	3	-41,20	17,60	-16,87	30,68
OspCBaf	12	-36,70	815,40	157,58	286,34
OspCBga	5	-3,40	878,60	235,12	365,00
OspCBsp	10	-54,90	573,80	111,25	248,86
p18Bss	2	-26,90	526,20	249,65	391,10
p18Baf	38	-41,20	1425,00	298,77	371,13
p18Bg1(B. bav)	47	-55,90	1841,00	382,92	346,89
p18Bg2 (B. gar)	1	-36,30	-36,30	-36,30	
p18Bsp	4	-26,90	405,40	142,55	203,37

Die nachfolgenden 11 Boxplot-Abbildungen (Abbildung 30) veranschaulichen die Streuung der Reaktivitäten der untersuchten Igelseren gegen die einzelnen Antigenbanden.



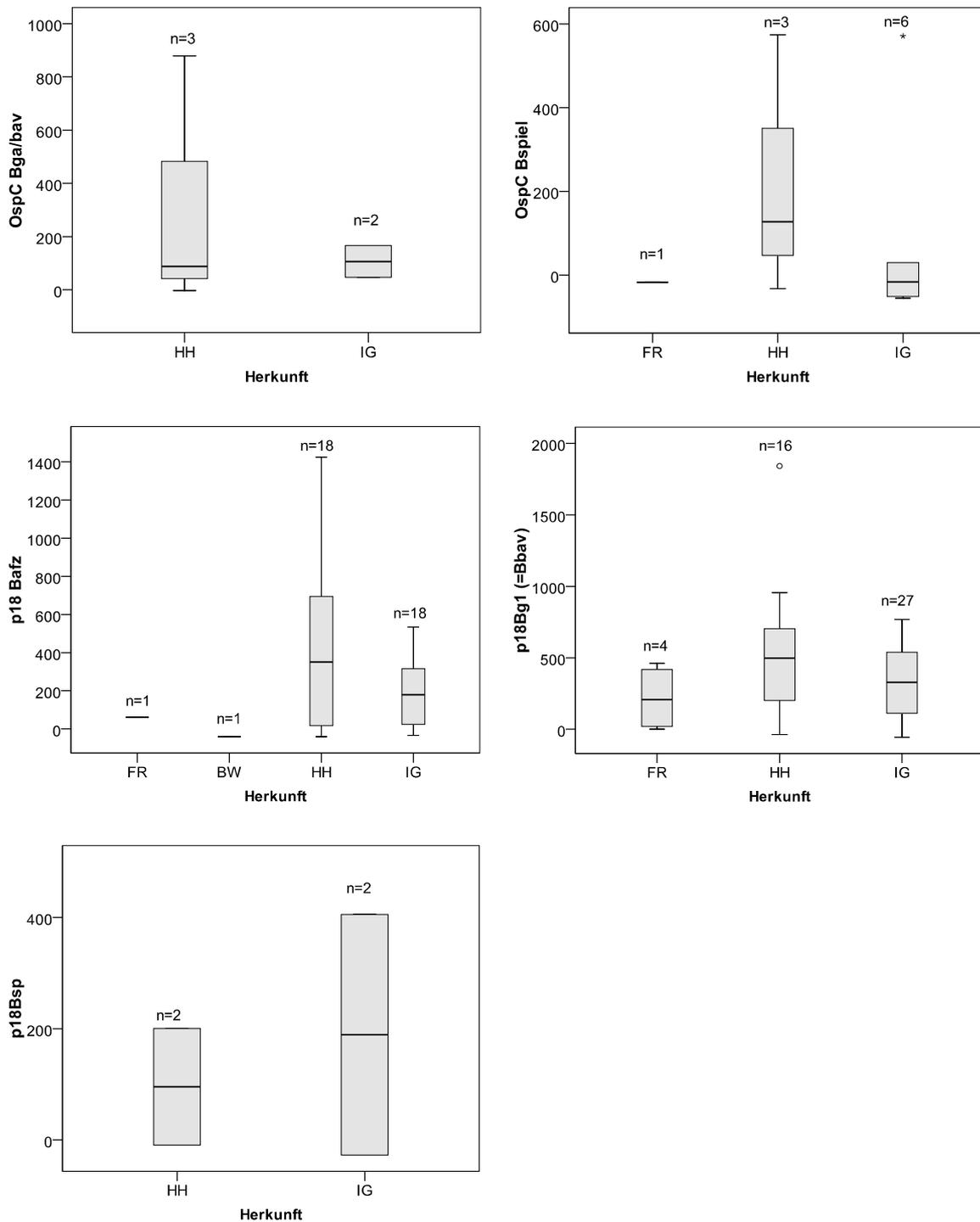


Abbildung 30: Stärke der Reaktivitäten (Y-Achse) gegen die einzelnen *Borrelia*-Antigene der Proben mit mindestens einer Antigen-Reaktivität aus Abbildung 29. Antigene mit zu geringer Stichprobengröße und mit Angaben zu Reaktivitäten aus lediglich einem Kollektiv wurden nicht dargestellt. FR=Frankfurt, BW=Baden-Württemberg, HH=Hamburg, IG=„Igelgarten“.

## 4.1.2 *Anaplasma phagocytophilum*

### 4.1.2.1 Molekularbiologischer Nachweis

Insgesamt wurden 271 DNA-Extrakte der Organpools von Igel mittels 16S rDNA-PCR auf dem LightCycler auf *Anaplasma phagocytophilum* überprüft (Tabelle 15). Da diese PCR nur ein relativ kurzes DNA-Fragment (344 bp) der 16S rDNA generiert, wurden positive Proben zusätzlich mithilfe einer nested PCR mit der gleichen Zielregion amplifiziert. Diese nested PCR sollte einerseits zusätzlich als Bestätigung dienen, aber auch andererseits zur Gewinnung eines möglichst langen DNA-Fragments für die Sequenzierung, um eventuell unterschiedliche 16S rDNA-Varianten aufzuspüren. Alle im LightCycler als positiv gewerteten Proben zeigten auch in dieser PCR starke Banden im Agarose-Gel.

Insgesamt erwiesen sich 24 der 271 untersuchten Igel als *A. phagocytophilum* positiv. Aufgeschlüsselt nach Igelart, waren 23 von 251 (9,2 %) *Erinaceus europaeus* und 1/10 der Art *E. concolor* (10,0 %) aus der Türkei infiziert. Bei den 10 untersuchten Tieren der Art *E. roumanicus* aus Österreich und Tschechien konnte keine *Anaplasma*-Infektion nachgewiesen werden (Tabelle 15). Die Prävalenzen lagen in Deutschland durchschnittlich zwischen 2,9 % (Hamburg) und 16,7 % (München).

Tabelle 15: Gesamtzahl der auf *Anaplasma phagocytophilum* getesteten Igel [n], Anzahl infizierter Igel [n\*] und Infektionsrate [%] aufgeteilt nach Herkunftsgebiet und Jahr.

	2005			2006			2007			2008			Gesamt		
	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]	[n]	[n*]	[%]
<b><i>E. europaeus</i></b>															
Oberrhein-Gebiet	1	0	0,0	13	1	7,7	1	0	0,0	8	2	25,0	23	3	13,0
Rhein-Main-Gebiet	0			23	3	13,0	29	4	13,8	2	0	0,0	54	7	13,0
Hamburg	2	0	0,0	7	0	0,0	12	0	0,0	16	1	6,3	37	1	2,7
Berlin	0			14	2	14,3	0			0			14	2	14,3
München	0			0			0			24	4	16,7	24	4	16,7
Bodensee	0			6	0	0,0	0			0			6	0	0,0
Niedersachsen	0			4	0	0,0	2	0	0,0	0			6	0	0,0
„Igelgarten“ Karlsruhe	1	0	0,0	15	2	13,3	5	0	0,0	18	2	11,1	39	4	10,3
Großbritannien	0			18	0	0,0	0			14	0	0,0	32	0	0,0
Tschechien	0			0			0			16	2	12,5	16	2	12,5
gesamt	4	0	0,0	100	8	8,0	49	4	8,2	98	11	11,2	251	23	9,2
<b><i>E. roumanicus</i></b>															
Tschechien	0			0			0			6	0	0,0	6	0	0,0
Österreich	4	0	0,0	0			0			0			4	0	0,0
gesamt	4	0	0,0	0			0			6	0		10	0	
<b><i>E. concolor</i></b>															
Türkei	0			10	1	10,0	0			0			10	1	10,0
gesamt				10	1	10,0							10	1	10,0
<b><i>Erinaceus spp. gesamt</i></b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>	<b>110</b>	<b>9</b>	<b>8,2</b>	<b>49</b>	<b>4</b>	<b>8,2</b>	<b>104</b>	<b>11</b>	<b>10,6</b>	<b>271</b>	<b>24</b>	<b>8,9</b>

Die Real-time PCR wurde als positiv gewertet, wenn ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz bis zum 33. Amplifikationszyklus zu beobachten war und die nachfolgende Schmelzpunktanalyse ein absolutes Maximum im Temperaturbereich zwischen 61 °C bis 63 °C zeigte (Abbildung 31 und Abbildung 32).

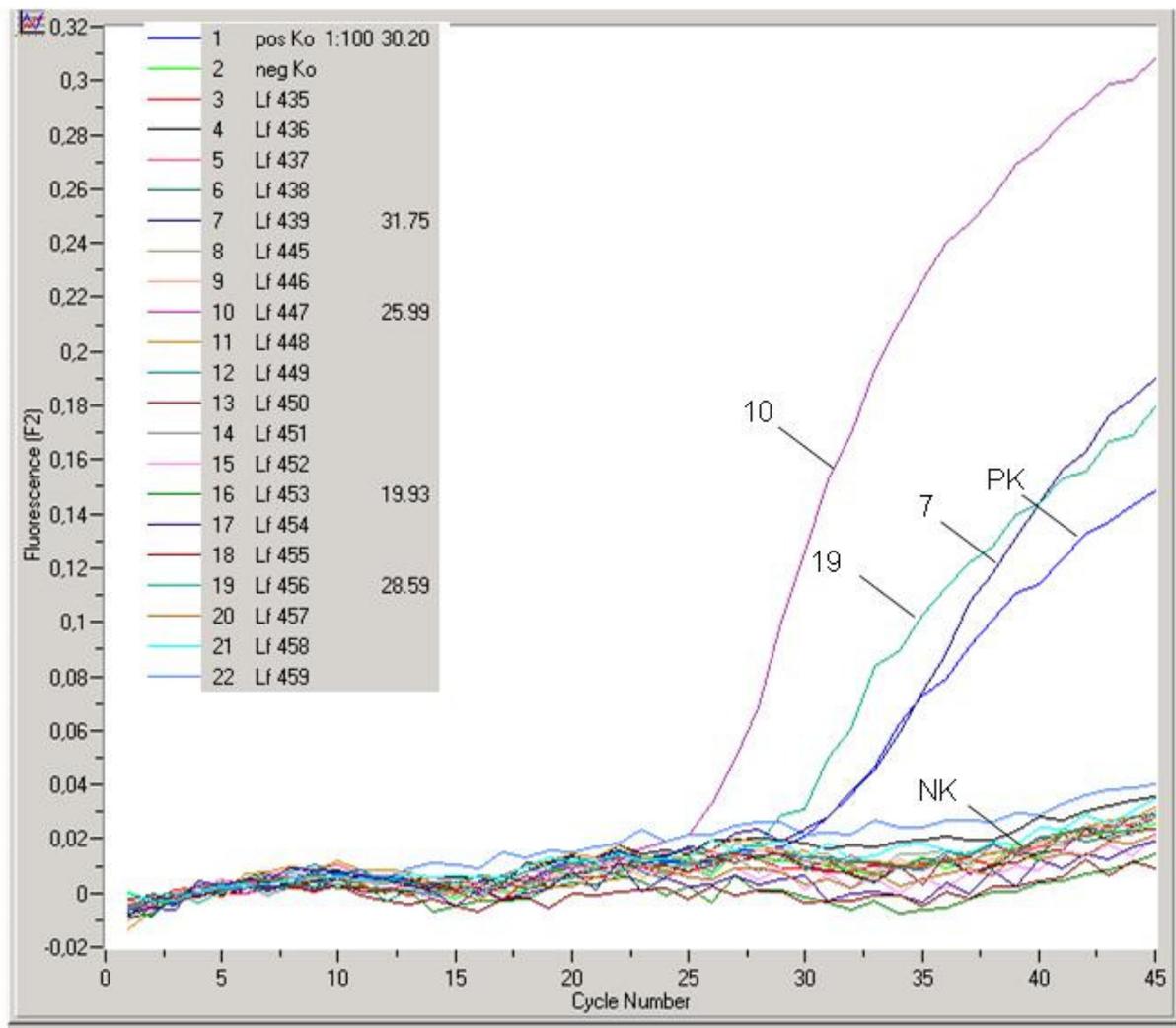


Abbildung 31: Nachweis von *Anaplasma phagocytophilum*. Exemplarische 16S rDNA-PCR auf dem LightCycler mit 20 Igelorganpools sowie der Positivkontrolle (PK) und Negativkontrolle (NK). Die positiven Proben sind jeweils mit Nummern versehen. Die Dezimalzahlen oben links geben die ct-Werte an.

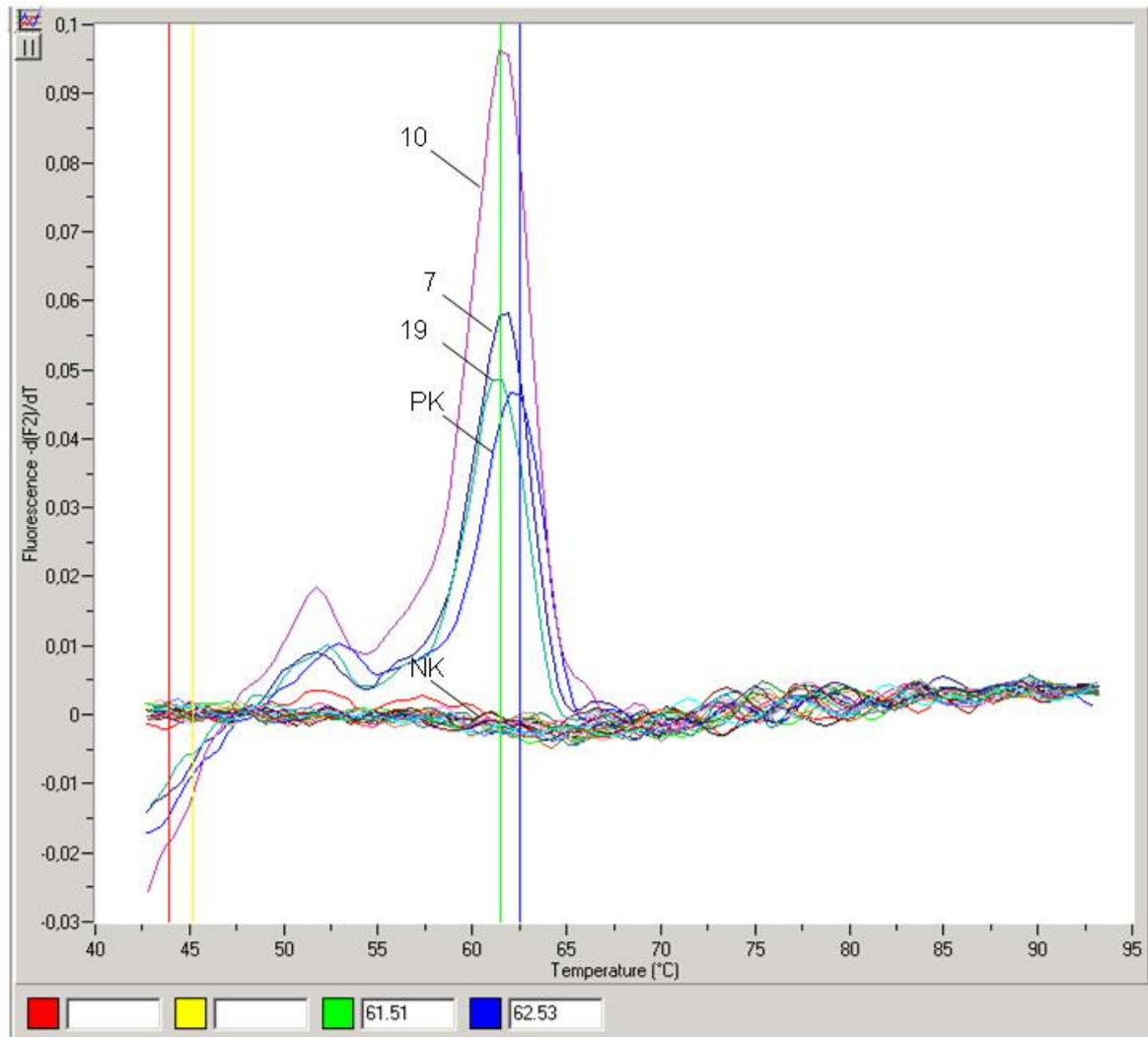


Abbildung 32: Die nachfolgende Schmelzpunktanalyse der positiven Proben aus Abbildung 31 zeigten Absorptionsmaxima zwischen 61 und 63 °C. PK=Positivkontrolle, NK=Negativkontrolle.

Für die statistische Analyse wurden die Jahre aufgrund der geringen Stichprobengrößen für jeden Herkunftsort zusammengefasst. Beim Vergleich der *Anaplasma*-Prävalenz von *E. europaeus* in den einzelnen Untersuchungsgebieten auf dem Festland zeigten sich keine signifikanten Unterschiede mittels Chi-Quadrat-Tests. Wiederum wich Großbritannien, wo keine infizierten Tiere gefunden wurden, fast signifikant von der Gesamtprävalenz auf dem Festland ab ( $X_1^2=3,7$ ;  $p=0,054$ ).

Männliche und weibliche Igel waren gleich oft mit Anaplasmen infiziert.

Die Infektionsrate in den verschiedenen Alterskategorien (juvenil, subadult, adult) zeigte keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16). Das Gewicht infizierter Tiere reichte von 142 g bis 1005 g.

Tabelle 16: Übersicht der untersuchten Sektionsigel, eingeteilt in die verschiedenen Alterskategorien (juvenil, subadult und adult) in Abhängigkeit ihres Gewichtes. Die *Anaplasma*-infizierten Gruppen sind fett dargestellt.

Igelart	Alterskategorie	Gewichtsgruppe 1 (100-500 g)	Gewichtsgruppe 2 (501-799 g)	Gewichtsgruppe 3 ( > 800 g)
		n infiziert/ n untersucht ( %)	n infiziert/ n untersucht ( %)	n infiziert/ n untersucht ( %)
<b><u>E. europaeus</u></b>				
Festland	juvenil	<b>5/55 (9,1 %)</b>	<b>1/2 (50,0 %)</b>	0
	subadult	<b>1/20 (5,0 %)</b>	<b>1/8 (12,5 %)</b>	0/1 (0,0 %)
	adult	0/13 (0,0 %)	<b>11/80 (13,7 %)</b>	<b>4/40 (10,0 %)</b>
Großbritannien	juvenil	0/11 (0,0 %)	0	0
	subadult	0/4 (0,0 %)	0/4 (0,0 %)	0
	adult	0/1 (0,0 %)	0/6 (0,0 %)	0/6 (0,0 %)
<b><u>E. roumanicus</u></b>				
	juvenil	0/8 (0,0 %)	0	0
	subadult	0	0	0
	adult	0	0/1 (0,0 %)	0/1 (0,0 %)
<b><u>E. concolor</u></b>				
	juvenil	<b>1/6 (16,6 %)</b>	0	0
	subadult	0	0	0
	adult	0	0/1 (0,0 %)	0/3 (0,0 %)

Auch hinsichtlich der Jahreszeiten (Frühling, Sommer, Herbst und Winter) konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der *Anaplasma*-Prävalenz ermittelt werden, wobei keine *A. phagocytophilum* infizierten Igel in den Wintermonaten gefunden wurden (Abbildung 33 und Tabelle 17).

Von März bis November waren Igel mit *A. phagocytophilum* infiziert (Tabelle 17). Die Prävalenzrate in diesen Monaten reichte von 5,3 % bis 20,0 %. Insbesondere im Frühjahr, aber auch im Herbst, lag die Prävalenz sehr hoch. Der infizierte *E. concolor* aus der Türkei war ein juveniler Igel und wog 250 g. Ein exakter Todeszeitpunkt war nicht angegeben.

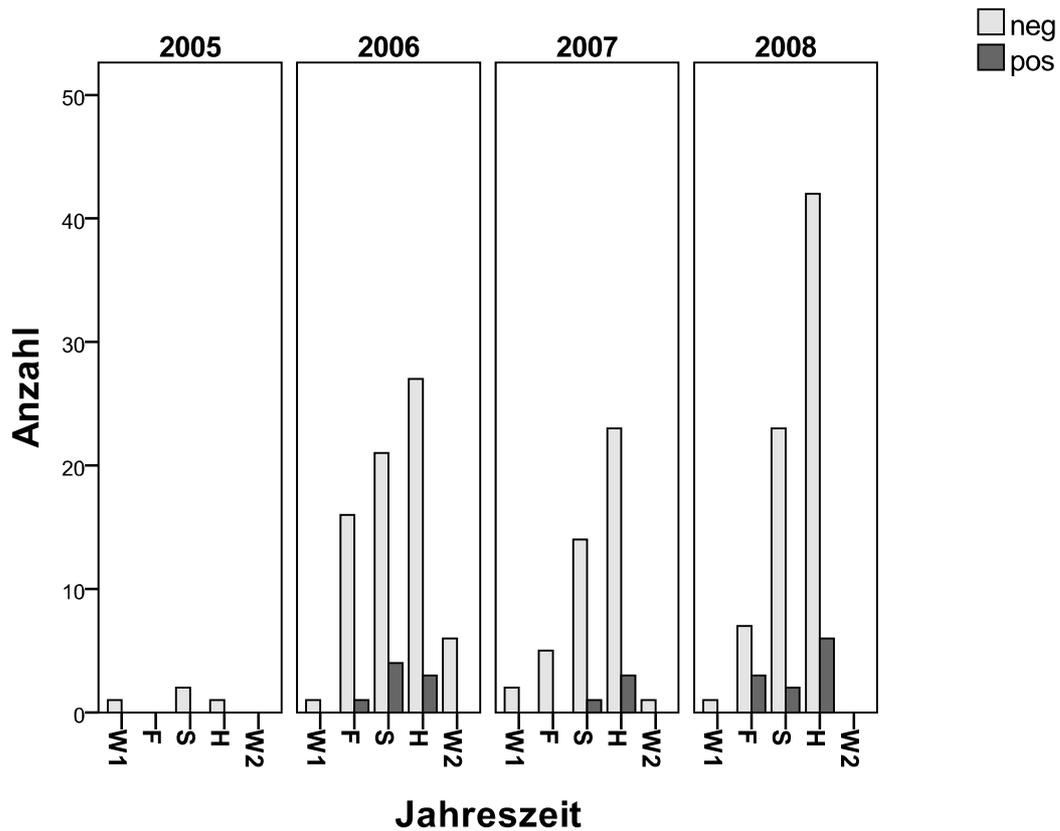


Abbildung 33: Jahreszeitliche Verteilung der *Anaplasma phagocytophilum*-infizierten (dunkelgrau) und nicht infizierten (hellgrau) *Erinaceus europaeus* auf dem Festland (n=216), W1=Winter (Januar, Februar), F=Frühling (März, April, Mai), S=Sommer (Juni, Juli, August), H=Herbst (September, Oktober, November), W2=Winter (Dezember).

Tabelle 17: *Anaplasma*-Prävalenz von *Erinaceus europaeus* auf dem Festland zu verschiedenen Monaten (n=216).

Monat	<i>Anaplasma</i>		Anzahl untersucht	Prävalenz (%)
	negativ	positiv		
Januar	2	0	2	0,0
Februar	3	0	3	0,0
März	10	1	11	9,1
April	4	1	5	20,0
Mai	14	2	16	12,5
Juni	15	1	16	6,3
Juli	18	1	19	5,3
August	27	5	32	15,6
September	47	7	54	13,0
Oktober	30	2	32	6,3
November	16	3	19	15,8
Dezember	7	0	7	0,0
gesamt:	193	23	216	10,6

#### 4.1.2.2 Sequenzierung und Klonierung der PCR-Produkte

Positive PCR-Produkte beider PCR-Systeme wurden sequenziert und mittels BLAST mit den bisher auf GenBank hinterlegten Einträgen verglichen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>; Stand: 20.09.2010). Die Elektropherogramme der nested PCR waren dabei deutlich besser abzulesen. Bei den auf dem LightCycler gewonnenen 16S rDNA-Fragmenten kam es teilweise zu starken Überlagerungen und zu wenig ausgeprägten Peaks der einzelnen Basen in der DNA-Sequenz. Daher wurden im weiteren Verlauf nur noch die Amplifikate der nested PCR sequenziert. Nach Korrektur ergab der Sequenzvergleich der durchschnittlich ca. 800 bp-Abschnitte mit anderen Einträgen auf GenBank nur eine Übereinstimmung von 99 %, da alle Igelsequenzen an derselben Stelle (siehe Pfeil in Abbildung 34) einen Basenunterschied (A anstelle von G) aufwiesen. Dieser Unterschied scheint igelspezifisch zu sein und wurde bisher noch bei keiner anderen Tierart gefunden. Abbildung 34 zeigt ein Sequenzalignment der typischen Igelvariante mit anderen *Anaplasma*-Isolaten aus Säugetieren. Eine 100 %ige Übereinstimmung zu den Isolaten aus *Erinaceus europaeus* zeigte auch die Sequenz des Igels der Art *E. concolor* aus der Türkei.

Insgesamt wurden 23 der generierten *A. phagocytophilum* Sequenzen auf GenBank hinterlegt (Acc. No. FN390873 bis FN390895). Die igelspezifische 16S rDNA-Variante wurde bei fast allen Igeln und den von den Igeln abgesammelten Zecken gefunden. Lediglich die Sequenz des Igels Lf 174 (Acc. No. FN 390881) unterscheidet sich in 2 Nukleotiden: sie hat an Stelle 351 ein A anstatt G und an der igelspezifischen Position (403) ein G. Diese Sequenz ist auf GenBank bisher einzigartig.

Das PCR-Produkt des Igels Lf 47, das starke Überlagerungen im Elektropherogramm zeigte, wurde mithilfe des TOPO TA cloning Kits kloniert und anschließend sequenziert. Das ursprüngliche PCR-Fragment stimmte zu 100 % mit der igelspezifischen 16 S rDNA-Variante überein (Acc.No. FN390878). Allerdings unterschied sich das erste klonierte Produkt (Clone 1, Acc.No FN390879) in 3 Positionen (435: C statt T; 623: G statt A, 938: C statt T) und das zweite Produkt (Clone 2, Acc.No. FN390880) wich an Stelle 300 von der ursprünglichen Lf 47 Sequenz ab (G statt A).

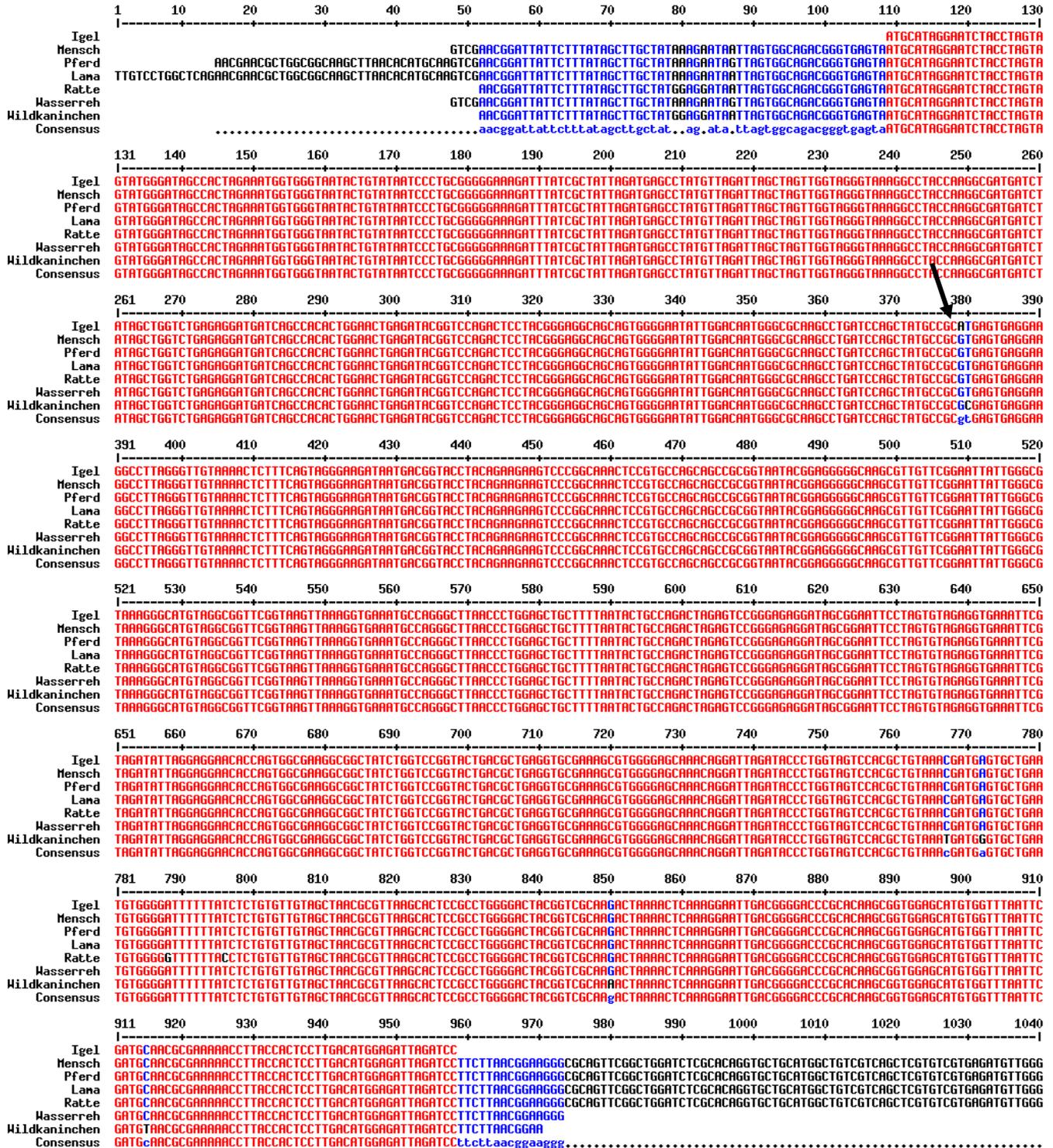


Abbildung 34: Sequenzalignment der typischen Igelvarianter von *Anaplasma phagocytophilum* mit anderen auf GenBank hinterlegten Sequenzen: Igel/Deutschland (FN390878), Mensch/USA (AF093789), Wildkaninchen/China (DQ458806), Wasserreh (*Hydropotes inermis argyropus*)/Korea (GU556624), Pferd/Schweden (AY527214), Lama/Schweden (AF241532), Ratte (*Niviventer coxingi*)/China (DQ458808).

### **4.1.3 *Rickettsia* spp.**

#### **4.1.3.1 Molekularbiologischer Nachweis**

Organpools von insgesamt 271 Igel wurden in der vorliegenden Studie mittels einer gIa-PCR auf das Vorhandensein von Rickettsien überprüft. In keiner der Proben konnten Rickettsien detektiert werden. Bei einem Igel (Nr. P4) aus dem Bienwald, dessen abgesammelten Zecken als hochgradig *Rickettsia*-positiv befundet worden waren (vgl. Abschnitt 4.3.4), wurde nachträglich eine Hautbiopsie mittels PCR untersucht, in der Rickettsien, aber nicht im dazugehörigen Organpool, detektiert werden konnten. Allerdings erbrachte die anschließende Sequenzierung keine Differenzierung bis zur Art.

### **4.1.4 FSME-Viren**

#### **4.1.4.1 Molekularbiologischer Nachweis**

Nur bei einem der 271 untersuchten Igel gelang der direkte Nachweis von FSME-Viren im Organgewebe mithilfe der reversen Transkription und des PCR-Systems nach Schrader & Süss (1999). Das infizierte Tier hatte eine detektierbare FSME-Infektion im Nierengewebe.

Aus dem Vorbericht des Igels ging hervor, dass er am 27.05.2006 mit einer starken Gesichtsverletzung in einem Potsdamer Garten gefunden wurde und eingeschläfert werden musste. Es handelte sich um ein ausgewachsenes, männliches Tier mit einem Gewicht von 1244 g. Der Zeckenbefall (1 Larve, 7 Nymphen, 1 Weibchen; alle als *Ixodes ricinus* bestimmt) wurde bei der Sektion als gering eingestuft. Alle abgesammelten Zecken wurden negativ auf FSME-Viren getestet.

Die in der PCR als positiv eingestufte Nierenprobe wurde zur Spezifitätsüberprüfung sequenziert. Der Sequenzvergleich des 131 bp langen Stückes mit BLAST ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem „TBEV Hypr polyprotein gene“ und eine 99 %ige Übereinstimmung mit dem FSME-Virusstamm TBEV Neudoerfl.

#### **4.1.4.2 Serologischer Nachweis**

Bei der serologischen Untersuchung von Igel mithilfe des Immunozyt FSME (TBE) IgG-All Species Kit konnten keine Antikörper gegen FSME-Viren bei den getesteten Igelseren festgestellt werden. Insgesamt wurden 90 Seren aus Baden-Württemberg (n=37), Hessen (n=35) und dem „Igelgarten“ (n=18) untersucht.

---

## 4.2 Experimentelle Untersuchung zur Übertragung von Borrelien

### 4.2.1.1 Experimenteller Infektionsweg

Um den Verlauf von Borrelieninfektionen bei Igel zu untersuchen, wurden 5 Tiere mit *Borrelia afzelii*-haltigen *Ixodes ricinus* Weibchen besetzt und 12 Wochen unter Laborbedingungen beobachtet. Die Tiere wurden zuvor im ELISA als *Borrelia* negativ befundet. Bei allen Igeln setzten sich die Zeckenweibchen erfolgreich fest und verblieben bis zum Abfallen auf den Wirten. Mindestens 3 der gesaugten *B. afzelii*-infizierten Zeckenweibchen pro Igel zeigten sich in der anschließenden PCR als *Borrelia*-positiv.

Keiner der 5 Igel entwickelte allerdings eine Infektion, die entweder über Xenodiagnose oder über PCR im Blut nachweisbar war. Dennoch zeigten alle Tiere ansteigende ELISA-Extinktionen, was für eine subklinische Infektion spricht (Tabelle 18). Die Immunantwort der Igel war unterschiedlich stark ausgeprägt. 3 Igel wiesen schon drei Wochen nach der Infektion ELISA-Extinktionen im positiven Wertebereich (Extinktion > 1,0) auf. Nach sechs Wochen hatten 4 von 5 Igeln detektierbare IgG-Antikörperspiegel im Blut.

Tabelle 18: Ergebnisübersicht der Igel, die experimentell mit *Borrelia afzelii* über 5 *Ixodes ricinus* Weibchen infiziert wurden. Dem Kontrolligel wurden uninferzierte *I. ricinus* Weibchen angesetzt. Eindeutig positiv getestete Seren (Extinktion im ELISA > 1,0) sind fett dargestellt. Neg=negativ, pos=positiv

	vor Infektion	Infektion	1.Woche	2.Woche	3. Woche	4.Woche	6.Woche	8.Woche	10.Woche	12.Woche
<b>Igel 1 (78FO)</b>										
ELISA Extinktion	0,247	0,297	0,294	0,315	0,432	0,632	0,587	<b>1,249</b>	<b>1,332</b>	<b>1,843</b>
pos <i>B. afzelii</i> Weibchen		3 von 5								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Igel 2</b>										
ELISA Extinktion	0,315	0,56	0,8	0,79	<b>1,43</b>	<b>1,598</b>	<b>2,38</b>	<b>2,03</b>	<b>1,894</b>	<b>2,412</b>
pos <i>B. afzelii</i> Weibchen		4 von 5								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Igel 3 (5C78)</b>										
ELISA Extinktion	0,413	0,325	0,984	<b>1,23</b>	<b>1,94</b>	<b>2,152</b>	<b>2,438</b>	<b>2,437</b>	<b>2,876</b>	<b>3,175</b>
pos <i>B. afzelii</i> Weibchen		5 von 5								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Igel 4 (631E)</b>										
ELISA Extinktion	0,196	0,256	0,331	0,744	<b>1,288</b>	<b>1,698</b>	<b>1,963</b>	<b>2,48</b>	<b>2,69</b>	<b>3,013</b>
pos <i>B. afzelii</i> Weibchen		4 von 5								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Igel 5 (7F7E)</b>										
ELISA Extinktion	0,2	0,382	0,644	0,872	0,754	0,961	<b>1,34</b>	<b>1,642</b>	<b>1,94</b>	<b>2,632</b>
pos <i>B. afzelii</i> Weibchen		4 von 5								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<b>Kontrolligel 1</b>										
ELISA Extinktion	0,076	0,2	0,495	0,382	0,099	0,176	0,428	0,267	0,532	0,364
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
positive Xenolarven		0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

#### 4.2.1.2 Natürlicher Infektionsweg

Bei 4 Igel, die langjährig im „Igelgarten“ gelebt hatten und 2 Tieren aus Igelstationen, die bisher wenig Kontakt zu Zecken hatten, erfolgte die Borrelien-Infektion auf natürlichem Weg durch einen einwöchigen Aufenthalt im „Igelgarten“ (02.-09. April 2009).

Die 2 erstmalig eingesetzten Tiere zeigten im Vergleich zu den anderen Igel zu Beginn des Experiments eine niedrige Extinktion im ELISA (Tabelle 19). Insbesondere diese beiden Tiere wiesen nach dem einwöchigen Aufenthalt im „Igelgarten“ einen hochgradigen Zeckenbefall auf und mussten aufgrund eines stark herabgesetzten Allgemeinbefindens (Lethargie, Appetitlosigkeit) therapiert werden (Infusionen und Zwangsernährung). Ein Tier (058E) mit enormer Zeckenlast (*Ixodes ricinus*: 69 Weibchen, 1206 Nymphen, 214 Larven; *I. hexagonus*: 5 Weibchen, 25 Nymphen, 175 Larven) verstarb am 14. April 2009. Bei der Sektion waren alle Organe hochgradig anämisch, und die Lymphknoten des Mesenterialgewebes waren auffällig vergrößert und schwärzlich verfärbt. Wie bei den anderen Sektionsigeln wurden Organproben sowie eine Probe der Mesenteriallymphknoten entnommen und mittels PCR auf zeckenübertragene Pathogene getestet. In keinem der entnommenen Organe konnte *Borrelia burgdorferi* s.l. nachgewiesen werden, allerdings erwies sich die entnommene Probe des Lymphgewebes als hochgradig *Borrelia bavariensis*-positiv.

Der zweite Igel (39D6) erholte sich und war 5 Wochen nach der Infektion klinisch unauffällig. In der 1. bis 11. Woche nach der Infektion konnte keine Xenodiagnose durchgeführt werden, da die Tiere in einer parallel laufenden Studie (Pfäffle 2010) für ein Blut-Regenerations-Experiment verwendet wurden. Durch die Xenodiagnose in der 12. Woche konnte demonstriert werden, dass der Igel 39D6 trotz unauffälligem Allgemeinbefinden 13 von 17 untersuchten Zecken mit *B. burgdorferi* s.l. infizierte (Tabelle 19). Dabei dominierte *B. afzelii* in der OspA-PCR, aber auch *B. spielmanii*-positive Zecken konnten gefunden werden. Während die Hautbiopsie bei allen anderen Tieren negativ war, wurde *B. afzelii*- und *B. spielmanii*-DNA bei diesem Igel in der 12. Woche auch in der Haut mithilfe der OspA-PCR nachgewiesen. Der Infektionsverlauf konnte nicht weiter verfolgt werden, da das Tier aufgrund einer stark entzündeten Zehenverletzung in der 13. Woche mit einem Antibiotikum (Baytril) behandelt werden musste. Auch nach zweimaliger Xenodiagnose konnten danach keine Borrelien mehr nachgewiesen werden.

Die Transmissionsrate von Borrelien auf Zecken war bei den Tieren, die langjährig im „Igelgarten“ gelebt hatten, nur sehr niedrig. Lediglich ein knapp 7-jähriger Igel infizierte 1 von 20 Zecken nach der 12. Woche mit *B. spielmanii*. Die Xenodiagnose, sowie die molekularbiologische Untersuchung der entnommenen Hautbiopsie waren bei allen 3 Tieren durchgängig negativ. Die ELISA-Blutuntersuchung der Igel aus dem „Igelgarten“ zeigte schon zu Beginn des Experiments eine hohe Konzentration von IgG-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* s.l., die im Verlauf der Untersuchung auf einem konstant hohen Niveau blieb (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht der natürlichen Infektion von Igelrn mit *Borrelia burgdorferi* s.l. durch einwöchigen Aufenthalt im „Igelgarten“. In der 1-7. Woche nach der Infektion erfolgte keine Xenodiagnose. W=Weibchen, M=Männchen, NY=Nympe, LL=Larve, neg=negativ, pos=positiv, na=not available, nicht verfügbar.

	vor	Infektion	1.Woche	5.Woche	7.Woche	12.Woche	13.Woche	14.Woche	
<b>langjährig im "Igelgarten"</b>	25. Mrz	02. Apr 09. Apr	14. Apr	12. Mai	26. Mai	26. Jun	02. Jul	09. Jul	
<b><u>Igel 1 7CCF (3,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		12W,8M,242NY,22LL							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		0W,0M,0NY,5LL							
ELISA Extinktion	2,864		3,659	3,589	3,178	3,406	3,184	3,287	
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	
positive Xenolarven						0/20	0/20	0/20	
Hautbiopsie						neg			
<b><u>Igel 2 4B25 (6,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		17W,8M,55NY,5LL							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		0W,0M,0NY,2LL							
ELISA Extinktion	2,894		3,498	3,831	3,666	3,621	2,942	3,598	
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	
positive Xenolarven						1/20	0/20	0/20	
Hautbiopsie						neg			
<b><u>Igel 3 0D98 (2,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		5W,2M,22NY,0LL							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		2W,0M,2NY,1LL							
ELISA Extinktion	3,298		3,566	3,791	3,919	3,975	3,753	3,916	
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	
positive Xenolarven						0/20	0/20	0/20	
Hautbiopsie						neg			
<b><u>Igel 4 6D4C (2,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		13W,1M,321NY,49LL							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		0W,0M,1NY,1LL							
ELISA Extinktion	3,654		3,652	3,701	3,86	3,718	3,286	3,378	
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg		neg	neg	neg	neg	neg	neg	
positive Xenolarven						0/20	0/20	0/20	
Hautbiopsie						neg			
<b>erstmalig im "Igelgarten":</b>									
<b><u>39D6 (1,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		31W,12M,447NY,52LL							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		4W,0M,9NY,80LL							
ELISA Extinktion	0,806		na	2,75	3,557	3,872	3,943	3,712	
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg		na	neg	neg	neg	neg	neg	
positive Xenolarven						13/17	0/20	0/20	
Hautbiopsie						pos			
<b><u>058E (1,5-jährig)</u></b>									
Anzahl <i>I. ricinus</i>		69W,0M,1206NY,214LL gestorben							
Anzahl <i>I. hexagonus</i>		5W,0M,25NY,175LL							
ELISA Extinktion	1,375								
PCR EDTA-Blut (200 µl)	neg								

### 4.3 Pathogene in Zecken von Igel

Insgesamt wurden 1283 Zeckenindividuen von 33 Igel abgesammelt, 767 als *I. hexagonus* und 516 als *I. ricinus* bestimmt. Diese wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit auf Borrelien und Anaplasmen mittels der beschriebenen LightCycler Protokolle untersucht.

Die DNA-Extrakte stammten aus der Diplomarbeit von Perseke (2010), wo sie bereits molekularbiologisch auf Rickettsien mittels glta-PCR auf dem LightCycler untersucht worden waren. Dabei war die DNA der adulten Zecken einzeln extrahiert worden, die von Nymphen in Pools zu je 5 Individuen und von Larven in Pools zu je 10 Individuen. Tabelle 20 zeigt die Anzahl der einzelnen Zeckenstadien aus den verschiedenen Gebieten und die daraus resultierende Anzahl an Zeckenpools.

Bei der Untersuchung zeigte sich, dass viele positiv getestete Zecken von einem Igel (Nr. P4 im Anhang) aus dem Bienwald stammten. Daher wurde zusätzlich versucht, die Beteiligung einzelner Igel bei der Verbreitung von Erregern darzustellen (4.3.4).

Tabelle 20: Anzahl der untersuchten Zeckenindividuen und der daraus resultierenden Anzahl an Zeckenpools.

Hex=*Ixodes hexagonus*, ric=*I. ricinus*, W=Weibchen, M=Männchen, NY=Nympe LL=Larve.

<b>Individuen</b>								
<b>Herkunft</b>	<b>hexW</b>	<b>hexM</b>	<b>hexNY</b>	<b>hexLL</b>	<b>ricW</b>	<b>ricM</b>	<b>ricNY</b>	<b>ricLL</b>
Großbritannien	109	0	125	89	0	0	0	0
Hamburg	39	0	91	8	24	5	23	36
Bienwald	2	0	37	24	8	1	270	126
Berlin	43	0	102	55	5	1	8	0
Hooksiel	0	0	8	20	0	0	0	0
Esslingen	7	0	8	0	8	1	0	0
gesamt	200	0	371	196	45	8	301	162
<b>Pools</b>								
<b>Herkunft</b>	<b>hexW</b>	<b>hexM</b>	<b>hexNY</b>	<b>hexLL</b>	<b>ricW</b>	<b>ricM</b>	<b>ricNY</b>	<b>ricLL</b>
Großbritannien			28	10			0	0
Hamburg			21	1			6	6
Bienwald			10	4			56	13
Berlin			23	7			3	0
Hooksiel			3	2			0	0
Esslingen			2	0			0	0
gesamt			87	24			65	19

### 4.3.1 *Borrelia* spp.

Insgesamt waren deutlich mehr *Ixodes ricinus* Proben positiv als *Ixodes hexagonus* (Tabelle 21). Bei *I. hexagonus* waren 3 Weibchen und 1 Nymphenpool mit Borrelien infiziert. Die durchschnittliche Infektionsrate lag unter 2,0 %. Im Vergleich dazu konnten bei *I. ricinus* 4 infizierte Weibchen, 44 positive Nymphenpools und 11 positive Larvenpools festgestellt werden. Bei den positiven Larven- und Nymphen-Pools wurde zur Prävalenz zusätzlich die Mindestinfektionsrate (MIR) angegeben, bei der davon ausgegangen wird, dass mindestens eine Zecke pro Pool positiv ist.

Tabelle 21: *Borrelia burgdorferi* s.l. Infektionsrate (%) der getesteten Zeckenstadien. Bei positiven Larven- und Nymphenpools wurde zusätzlich noch die Mindestinfektionsrate des Pools (MIR in [%]) errechnet. Hex=*Ixodes hexagonus*, ric=*I. ricinus*, W=Weibchen, M=Männchen, NY=Nymphe LL=Larve, nu=nicht untersucht.

<b><i>B. burgdorferi</i> s.l. in <i>I. hexagonus</i> (Pools)</b>						
Herkunft	hexW(%)	hexM(%)	hexNY(%)	MIR[%]hexNY	hexLL(%)	MIR[%]hexLL
Großbritannien	0/109 (0,0)	nu	0/28 (0,0)		0/10 (0,0)	
Hamburg	1/39 (2,6)	nu	0/21 (0,0)		0/1 (0,0)	
Bienwald	1/2 (50,0)	nu	0/10 (0,0)		0/4 (0,0)	
Berlin	1/43 (2,3)	nu	1/23 (4,3)	1,0	0/7 (0,0)	
Hooksiel	nu	nu	0/3 (0,0)		0/2 (0,0)	
Esslingen	0/7 (0,0)	nu	0/2 (0,0)		nu	
<b>gesamt</b>	<b>3/200 (1,5)</b>	<b>nu</b>	<b>1/87 (1,1)</b>	<b>0,3</b>	<b>0/24 (0,0)</b>	
<b><i>B. burgdorferi</i> s.l. in <i>I. ricinus</i> (Pools)</b>						
Herkunft	ricW(%)	ricM(%)	ricNY(%)	MIR[%]ricNY	ricLL(%)	MIR[%]ricLL
Großbritannien	nu	nu	nu		nu	
Hamburg	1/24 (4,2)	0/5 (0,0)	2/6 (33,3)	8,7	0/6 (0,0)	
Bienwald	2/8 (25,0)	0/1 (0,0)	41/56 (73,2)	15,2	11/13 (84,6)	8,7
Berlin	1/5 (20,0)	0/1 (0,0)	1/3 (33,3)	12,5	nu	
Hooksiel	nu	nu	nu		nu	
Esslingen	0/8 (0,0)	0/1 (0,0)	nu		nu	
<b>gesamt</b>	<b>4/45 (8,9)</b>	<b>0/8 (0,0)</b>	<b>44/65 (67,7)</b>	<b>14,6</b>	<b>11/19 (57,9)</b>	<b>6,8</b>

2 der infizierten *I. hexagonus* Weibchen zeigten in der OspA-PCR auf dem LightCycler eine Infektion mit *B. afzelii*, das dritte Weibchen mit *B. bavariensis*. Der Nymphenpool von *I. hexagonus* war ebenfalls positiv für *B. afzelii*.

Bei den 4 *I. ricinus* Weibchen waren 2 mit *B. afzelii* und jeweils 1 Weibchen mit

*B. spielmanii* und *B. bavariensis* infiziert.

Die Nymphen- und Larvenpools zeigten in der OspA-PCR insbesondere hohe Peaks bei *B. afzelii*, aber auch bei *B. spielmanii* und Mischinfektionen von beiden Genospezies an. Zusätzlich wurden die positiven PCR-Produkte stichprobenartig sequenziert. Die meisten Elektropherogramme waren allerdings aufgrund der starken Überlagerungen nicht auswertbar.

### 4.3.2 *Anaplasma* spp.

Die *Anaplasma*-Prävalenz in gesaugten Zecken lag im Vergleich zu den Organproben auf einem sehr niedrigen Niveau. Nur im Bienwald konnten 20 von 65 *Ixodes ricinus* Nymphenpools mittels der 16S rDNA-PCR auf dem LightCycler als positiv bewertet werden (Tabelle 22). Alle positiven Pools stammten allerdings von einem einzelnen Igel (vgl. Kapitel 4.3.4).

Tabelle 22 *Anaplasma* Infektionsrate (%) der getesteten Zeckenstadien. Bei positiven Larven- und Nymphenpools wurde zusätzlich noch die Mindestinfektionsrate des Pools (MIR in [%]) errechnet. Hex=*Ixodes hexagonus*, ric=*I. ricinus*, W=Weibchen, M=Männchen, NY=Nymphe LL=Larve, nu=nicht untersucht.

<b><u>Anaplasma Infektionsrate in <i>I. hexagonus</i> (Pools)</u></b>						
<b>Herkunft</b>	<b>hexW(%)</b>	<b>hexM(%)</b>	<b>hexNY(%)</b>	<b>MIR[%]hexNY</b>	<b>hexLL(%)</b>	<b>MIR[%]hexLL</b>
Großbritannien	0/109 (0,0)	nu	0/28 (0,0)		0/10 (0,0)	
Hamburg	0/39 (0,0)	nu	0/21 (0,0)		0/1 (0,0)	
Bienwald	0/2 (0,0)	nu	0/10 (0,0)		0/4 (0,0)	
Berlin	0/43 (0,0)	nu	0/23 (0,0)		0/7 (0,0)	
Hooksiel	nu	nu	0/3 (0,0)		0/2 (0,0)	
Esslingen	0/7 (0,0)	nu	0/2 (0,0)		nu	
<b>gesamt</b>	<b>0/200 (0,0)</b>	<b>nu</b>	<b>0/87 (0,0)</b>		<b>0/24 (0,0)</b>	
<b><u>Anaplasma Infektionsrate in <i>I. ricinus</i> (Pools)</u></b>						
<b>Herkunft</b>	<b>ricW(%)</b>	<b>ricM(%)</b>	<b>ricNY(%)</b>	<b>MIR[%]ricNY</b>	<b>ricLL(%)</b>	<b>MIR[%]ricLL</b>
Großbritannien	nu	nu	nu		nu	
Hamburg	0/24 (0,0)	0/5 (0,0)	0/6 (0,0)		0/6 (0,0)	
Bienwald	0/8 (0,0)	0/1 (0,0)	20/56 (35,7)	7,4	0/13 (0,0)	
Berlin	0/5 (0,0)	0/1 (0,0)	0/3 (0,0)		nu	
Hooksiel	nu	nu	nu		nu	
Esslingen	0/8 (0,0)	0/1 (0,0)	nu		nu	
<b>gesamt</b>	<b>0/45 (0,0)</b>	<b>0/8 (0,0)</b>	<b>20/65 (30,8)</b>	<b>6,6</b>	<b>0/19 (0,0)</b>	

### 4.3.3 *Rickettsia* spp.

Im Gegensatz zu den Organpools konnten Rickettsien in gesaugten Zecken, die von Igelstammten, zu einem hohen Prozentsatz in allen untersuchten Entwicklungsstadien, selbst in Larven, nachgewiesen werden. Sowohl *I. ricinus* als auch *I. hexagonus* waren infiziert (Tabelle 23). Die Mindestinfektionsrate in *I. hexagonus* Stadien lag bei 2,0 % (Larven) bzw. 3,5 % (Nymphen) und reichte bis zu 40,5 % (Weibchen). Auch in Großbritannien war ein großer Prozentsatz der *I. hexagonus* Weibchen (48,6 %) mit Rickettsien infiziert. Die Gesamtprävalenz in *I. ricinus* Weibchen (37,8 %) lag geringfügig niedriger als in *I. hexagonus* Weibchen. Die Mindestinfektionsrate bei *I. ricinus* Pools lag zwischen 8,0 % (Larven) und 17,6 % (Nymphen).

Die Sequenzierung einzelner positiver Zeckenisolate wurde in der Arbeit von Perseke (2010) durchgeführt und erbrachte den Nachweis von *Rickettsia helvetica*.

Tabelle 23: *Rickettsia*-Infektionsrate (%) der getesteten Zeckenstadien Bei positiven Larven- und Nymphenpools wurde zusätzlich noch die Mindestinfektionsrate des Pools (MIR in %) errechnet. Hex=*Ixodes hexagonus*, ric=*I. ricinus*, W=Weibchen, M=Männchen, NY=Nympe LL=Larve, nu=nicht untersucht.

<b><i>Rickettsia</i> Infektionsrate in <i>I. hexagonus</i> (Pools)</b>						
Herkunft	hexW (%)	hexM (%)	hexNY (%)	MIR[ % ]hexNY	hexLL (%)	MIR[ % ]hexLL
Großbritannien	53/109 (48,6)	nu	1/28 (3,6)	0,8	0/10 (0,0)	
Hamburg	10/39 (25,6)	nu	1/21 (4,8)	1,1	0/1 (0,0)	
Bienwald	2/2 (100)	nu	8/10 (80,0)	21,6	2/4 (50,0)	8,3
Berlin	15/43 (34,9)	nu	3/23 (13,0)	2,9	2/7 (28,6)	3,6
Hooksiel	nu	nu	0/3 (0,0)		0/2 (0,0)	
Esslingen	1/7 (14,3)	nu	0/2 (0,0)		nu	
<b>gesamt</b>	<b>81/200 (40,5)</b>	<b>nu</b>	<b>13/87 (14,9)</b>	<b>3,5</b>	<b>4/24 (16,7)</b>	<b>2,0</b>
<b><i>Rickettsia</i> Infektionsrate in <i>I. ricinus</i> (Pools)</b>						
Herkunft	ricW (%)	ricM (%)	ricNY (%)	MIR[ % ]ricNY	ricLL (%)	MIR[ % ]ricLL
Großbritannien	nu	nu	nu		nu	
Hamburg	1/24 (4,2)	2/5 (40,0)	1/6 (16,7)	4,3	0/6 (0,0)	
Bienwald	8/8 (100,0)	1/1 (100,0)	51/56 (91,1)	18,9	13/13 (100,0)	10,3
Berlin	1/5 (20,0)	0/1 (0,0)	1/3 (33,3)	12,5	nu	
Hooksiel	nu	nu	nu		nu	
Esslingen	7/8 (87,5)	0/1 (0,0)	nu		nu	
<b>gesamt</b>	<b>17/45 (37,8)</b>	<b>3 (37,5)</b>	<b>53/65 (81,5)</b>	<b>17,6</b>	<b>13/19 (68,4)</b>	<b>8,0</b>

#### 4.3.4 Einzelne Tiere als “Superspreaders”

Die auf Pathogene getesteten Zecken stellen ein Probenkollektiv von 33 einzelnen Igel dar und sind hinsichtlich der untersuchten Anzahl, den verschiedenen Entwicklungsstadien und der Stichprobengröße der einzelnen Standorte stark heterogen. Es wurde daher versucht, die Igel auf individueller Ebene bezüglich ihrer Beteiligung an der Verbreitung infizierter Zecken („Superspreaders“) zu charakterisieren. Dafür wurden die Tiere in 5 verschiedene Kategorien eingeteilt, die angeben, wie viel % infizierter Zecken ein Igel beisteuerte (Tabelle 24). Dabei fällt auf, dass die Mehrzahl der Tiere keine infizierten Zecken beherbergten. Nur auf 7 der 33 Igel (21,2 %) konnten *Borrelia*-positive Zecken und nur auf einem Igel *Anaplasma*-positive Zecken gefunden werden. *Rickettsia*-haltige Zecken wurden auf 22 Tieren nachgewiesen, allerdings stammten 131 von 184 positiv getesteten Pools (71,2 %) von nur 8 Individuen.

Tabelle 24: Einteilung der 33 Igel in 5 Kategorien hinsichtlich des Infektionsstatus ihrer getesteten Zecken

	Igel mit uninfizierten Zecken	Igel mit infizierten Zecken			
		Erregerprävalenz			
		1-25 %	25-50 %	50-75 %	75-100 %
<i>Borrelia</i>	26	5	1	1	0
<i>Anaplasma</i>	32	0	1	0	0
<i>Rickettsia</i>	11	10	4	4	4

12 Tiere, von denen alle *Borrelia*-, *Anaplasma*- und mehr als 50 % infizierter *Rickettsia*-Zecken abgesammelt wurden, sind in Tabelle 25 individuell aufgeführt. Auf nur 5 Igel wurden 1 bis 2 *Borrelia*-infizierte Zecken/Pools gefunden. Auffällig ist, dass alle diese Tiere auch mit *Rickettsien* koinfiziert sind. Der Igel (P4, Lf Sek ID: 1; im Anhang: Tabelle 29) aus dem Bienwald hatte offenbar eine akute Bakteriämie mit allen 3 Erregergruppen: dieser Igel steuerte alle infizierten *Anaplasma*-Proben bei; ebenso waren mehr als 50 % bis annähernd 100 % seiner untersuchten Zecken mit *Borrelien* bzw. *Rickettsien* infiziert.

Auch in den getesteten Organproben dieses Sektionsigels wurden *Borrelia afzelii*, *B. spielmanii* und *Anaplasma phagocytophilum* mittels PCR nachgewiesen. *Rickettsien* konnten nicht in dessen Organpool detektiert werden, sondern nur in der entnommenen Hautprobe.

Tabelle 25: Igelindividuen mit *Borrelia*-, *Anaplasma*- und *Rickettsia*-infizierten Zecken bzw. Zeckenpools.  
(Farbcodierungen entsprechen denen aus Tabelle 24).

Igel Nr.	Herkunft	<i>Borrelia</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Rickettsia</i>
P1	Großbritannien	0	0	33/63
P2	Hamburg	2/35	0	4/35
P3	Hamburg	1/37	0	8/37
P4	Bienwald	53/68	20/48	66/68
P7	Hamburg	1/13	0	2/13
P11	Bienwald	0	0	2/3
P14	Berlin	4/12	0	1/12
P16	Großbritannien	0	0	5/7
P19	Bienwald	1/7	0	7/7
P23	Bienwald	1/9	0	9/9
P29	Esslingen	0	0	7/13
P30	Großbritannien	0	0	2/2

#### 4.4 Koinfektionen von Pathogenen

Sowohl im Wirtstier Igel als auch in den von Igel abgenommenen Zecken konnten Koinfektionen von verschiedenen Erregern nachgewiesen werden.

##### Im Wirtstier Igel

Mischinfektionen von verschiedenen *Borrelia*-Genospezies in Igel sind unter 4.1.1.2.1 dargestellt. 6 von 251 *Erinaceus europaeus* (2 weiblich, 4 männlich) wiesen Koinfektionen von *Borrelia burgdorferi* s.l. und *Anaplasma phagocytophilum* in den Organen auf (Tabelle 26). Auffällig ist, dass 3 der *Anaplasma*-positiven Tiere jeweils mit mehreren *Borrelia*-Genospezies infiziert waren.

Tabelle 26: Koinfektion von *Borrelia burgdorferi* s.l. und *Anaplasma phagocytophilum* in Igel.

		<i>A. phagocytophilum</i> positiv
Genospezies	<i>B. afzelii</i>	1
	<i>B. spielmanii</i>	1
	<i>B. afzelii</i> und <i>B. bavariensis</i>	1
	<i>B. afzelii</i> und <i>B. spielmanii</i>	1
	<i>B. afzelii</i> , <i>B. bavariensis</i> und <i>B. spielmanii</i>	1
	unklar (Genospezies nicht identifizierbar)	1
gesamt		6

**In vollgesogenen Zecken**

In 16 *I. ricinus* Nymphenpools konnten Mischinfektionen von *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* s.l. festgestellt werden. Allerdings stammten alle Zecken von dem Igel Nr. P4 aus dem Bienwald. Bis auf einen der 16 Pools waren alle zudem noch mit Rickettsien infiziert.

Koinfektionen von Borrelien und Rickettsien wurden in insgesamt 25 Nymphenpools, in 11 Larvenpools sowie in einem Weibchen von *I. ricinus* des Igels Nr. P4 nachgewiesen. Bei 2 weiteren Igeln aus dem Bienwald konnten Mischinfektionen von Borrelien und Rickettsien in jeweils einem Weibchen von *I. ricinus* und *I. hexagonus* gefunden werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 *Borrelia burgdorferi* s. l.

Der Zyklus von *Borrelia burgdorferi* s.l. wird in der Natur durch vielgestaltige Transmissionswege zwischen Zecken und wild lebenden Tieren, wie Nagern und Vögeln aufrecht erhalten (Gern 2008). Obwohl die Vektorkompetenz der Igelzecke *Ixodes hexagonus* im Labor nachgewiesen wurde (Gern et al. 1991) und die Reservoirkompetenz des Igels für Borrelien bestätigt werden konnte (Gern et al. 1997, 1998), ist die Rolle dieser Tierart in der Epidemiologie einzelner *Borrelia*-Genospezies noch weitgehend ungeklärt. Die Untersuchung der Sektionstiere, der Blutproben von lebenden Igeln und der von Igeln abgesammelten Zecken sowie die experimentelle Untersuchung zur Übertragung von Borrelien, lieferten daher erste wichtige Anhaltspunkte, für welche Genospezies des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes Igel ein mögliches Reservoir darstellen.

#### 5.1.1 Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme

Sowohl die 5S23S rDNA-PCR nach Rijpkema et al. (1995), als auch die OspA-PCR nach Rauter (2002) stellten sich als geeignet für den Nachweis von Borrelien in Igelorganen heraus. Die 5S23S rDNA-PCR erwies sich gegenüber der OspA-PCR auf dem LightCycler als geringfügig sensitiver. 2 Amplifikate der 5S23S rDNA-PCR, die sich bei der Sequenzierung *Borrelia spielmanii* zuordnen ließen, konnten trotz zweimaliger Wiederholung nicht auf dem LightCycler detektiert werden. 2 weitere Isolate, die in der 5S23S rDNA-PCR als positiv gewertet wurden, konnten weder in der OspA-PCR noch in der Sequenzierreaktion näher charakterisiert werden.

Für das Screening eines Igels auf Borrelien wurde zunächst ein Organpool bestehend aus Lunge, Leber, Milz, Herz, Niere und Blase in der PCR überprüft. Dieses Verfahren erwies sich als sinnvoll, da dadurch alle Borrelien eines Igels erfasst werden konnten. Wie sich bei der nachfolgenden Testung der einzelnen Organe herausstellte, eigneten sich die Einzelorgane unterschiedlich gut für den Nachweis von Borrelien bzw. waren die Genospezies unterschiedlich lokalisiert. Hautproben wurden bewusst aus den Organpools ausgeschlossen, da eine Infektion der Haut nur lokal bestehen kann (Kjelland et al. 2011). Das Ziel der Untersuchung war es aber, zu überprüfen, ob Borrelien in Igeln eine systemische Infektion

bewirken und in innere Organe disseminieren können.

Die OspA-PCR auf dem LightCycler ist zwar prinzipiell für den Nachweis von *Borrelia*-Mischinfektionen geeignet, allerdings besitzen *Borrelia afzelii* und *B. valaisiana* die gleiche Schmelzpunkttemperatur. Da *B. valaisiana* in europäischen Studien hauptsächlich in wirtssuchenden Zecken sowie in Vögeln gefunden wird (Oehme et al. 2002, Gern 2008), war davon auszugehen, dass es sich bei den Absorptionsmaxima der positiven Igelproben bei 72°C um *B. afzelii* Stämme handelte. Die anschließende Sequenzierung der Proben bestätigte diese Vermutung.

Zur gewählten Methodik der *Borrelia*-Untersuchung ist zu bemerken, dass die Untersuchung eines Organpools eine kostengünstige und schnelle Alternative zur Testung von Einzelorganproben darstellt, und sich somit für ein erstes Screening von Wirtstieren hervorragend eignet. Ebenso wird durch die Verwendung einer gepoolten Organprobe die Wahrscheinlichkeit erhöht, alle *Borrelia* eines Igels zu erfassen.

## 5.1.2 Epidemiologische Daten

### 5.1.2.1 *Borrelia burgdorferi* s.l. im Wirtstier Igel

In insgesamt 37 von 285 (13,0 %) Igeln der Gattung *Erinaceus* wurden molekularbiologisch *Borrelia*-Infektionen mit Organbeteiligung nachgewiesen. Dabei handelte es sich um 35 Tiere der Gattung *Erinaceus europaeus* und um 2 Tiere der Gattung *E. roumanicus*. Der Chi-Quadrat-Test mit Kontingenztabelle erbrachte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Infektionsraten für *E. europaeus* zwischen den Herkunftsgebieten auf dem Festland. Die Prävalenzen in den einzelnen Herkunftsgebieten reichten für *E. europaeus* von 0 % (Niedersachsen) bis zu 37,5 % (Tschechien).

Die Prävalenzen von *Borrelia burgdorferi* s.l. in *E. europaeus* in den Untersuchungsgebieten in Großbritannien wichen davon signifikant ab, da dort keine infizierten Igel gefunden werden konnten. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf den isolierten Inselstatus zurückzuführen. In Großbritannien kommen viele Erreger (z.B. Hantaviren, *Francisella tularensis*) trotz der Nähe zum Festland (noch) nicht vor (Duff et al. 2010). Obwohl *B. burgdorferi* s.l. in Zecken und in endemischen Foci dort nachgewiesen werden konnte (Kurtenbach et al. 1998 a, Davidson et al. 1999, Ling et al. 2000), ist die Inzidenzrate im Vergleich zum Festland sehr niedrig. In Schottland lag sie in den Jahren 2002 bis 2005 bei 1,72 pro 100.000 Einwohner, in England und Wales während 1997 bis 2005 sogar nur bei 0,59 pro 100.000 (Hubálek 2009).

Um Erreger weiterhin fernzuhalten, ist die Einfuhr von Tieren und anderen biologischen Gütern nach Großbritannien stark reglementiert. Die abgesammelten Zecken der Igel aus Großbritannien wurden alle als *Ixodes hexagonus* bestimmt. Wie die Untersuchung der vollgesogenen Zecken beweist, waren auf dem Festland weitaus weniger *I. hexagonus* Stadien mit Borrelien infiziert, als *I. ricinus* Stadien. Möglicherweise ist der Infektionsdruck dieser Zeckenart auf Igel nicht so stark ausgeprägt, und es konnten daher keine *B. burgdorferi* s.l.-infizierten Igel in Großbritannien gefunden werden.

Im Vergleich zu Großbritannien wird die jährliche Inzidenzrate in der menschlichen Bevölkerung in Österreich auf 130 pro 100.000 und in Deutschland auf 25 pro 100.000 Einwohner geschätzt. In Tschechien wurde in den Jahren 1989 bis 2006 eine Inzidenzrate von 31,73 pro 100.000 ermittelt (Hubálek 2009). Die Türkei gilt weitestgehend als Borreliose-frei mit einer Inzidenzrate von lediglich 0,01 pro 100.000 Einwohner (Hubálek 2009). Die in Igeln ermittelten *Borrelia*-Prävalenzen zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster: in Österreich waren 50,0 % der untersuchten Tiere (*E. roumanicus*) positiv, gefolgt von Tschechien mit insgesamt 27,3 % (*E. europaeus* und *E. roumanicus* zusammen), in Deutschland 13,4 % (*E. europaeus*) und in der Türkei 0,0 % (*E. concolor*). Allerdings ist dies nur als Trend zu bewerten und zudem zu berücksichtigen, dass das Probenkollektiv sehr inhomogen war: die untersuchten Igel stammten aus verschiedenen Igelstationen und waren unterschiedlich stark parasitär vorbelastet zu manchen Regionen wurden z.B. Daten nur während eines Jahres oder zu einer bestimmten Jahreszeit gewonnen, oder die Probenanzahl (z.B. aus Österreich) war sehr gering. Dennoch zeigt die Untersuchung, dass sowohl *E. europaeus* als auch *E. roumanicus* für verschiedene Genospezies des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes empfänglich sind.

### **Saisonalität**

Bezüglich der Jahreszeit kann die *Borrelia*-Prävalenz in Zecken und Wirtstieren erheblichen Schwankungen unterworfen sein. Nach Tälleklint & Jaenson (1996) tritt in den Herbstmonaten die höchste Dichte borrelieninfizierter Reservoirwirte auf. Laut Hudson (1995) stimmen Zeiträume, die von hoher Zeckenabundanz geprägt sind, zufällig mit der Produktion von jungen und damit empfänglichen Wirtstieren überein. Diese Wirte („susceptible hosts“) sind sowohl in hohem Maße anfällig für Zecken als auch für zeckenübertragene Erreger.

In Igelstationen werden vor allem in den Herbstmonaten kranke und untergewichtige Igel in großer Zahl behandelt. Jungigel stellen neue empfängliche *Borrelia*-Wirte dar, da sie noch keinen (ausreichenden) Immunstatus aufgebaut haben. Die Wahrscheinlichkeit, dass junge Igel nach einem Zeckenbefall eine Bakteriämie und klinische Anzeichen einer Borreliose entwickeln, ist also im Herbst sehr hoch. Dies führt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit dazu, dass sich viele Zecken während dieser Jahreszeit über eine Blutmahlzeit an Igeln mit Borrelien infizieren. Schlee (2005) geht bei ihren Untersuchungen ebenfalls davon aus, dass Jungtiere, die zum ersten Mal in Kontakt mit Borrelien kommen, entscheidend zur Verbreitung infizierter Zecken beitragen. Über welchen Zeitraum Borrelien in infizierten Wirtstieren persistieren und an saugende Zecken weitergegeben werden können, ist bislang allerdings wenig untersucht.

Nicht nur bei Jungigeln, sondern auch bei kranken Tieren können die Abwehrmechanismen aufgrund multipler Parasitosen herabgesetzt sein, was zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber *B. burgdorferi* s.l. führen kann. Ein Großteil der adulten Tiere konnte in die Gewichtskategorie 1 (unter 500 g) und 2 (zwischen 500 und 750 g) eingeordnet werden, was für einen schlechten Allgemeinzustand dieser Tiere spricht. Ein gesunder, ausgewachsener Igel wiegt dagegen durchschnittlich 1000-1500 g (Schicht-Tinbergen 1989). Obwohl die Hypothese, dass vor allem Jungigel und untergewichtige Igel anfällig für Borrelieninfektionen sind, statistisch nicht ausreichend abgesichert werden konnte, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass es vorwiegend bei juvenilen und immunsupprimierten Tieren zu einer Erkrankung und auch zum Tod kommen kann, da nur 3 der 37 infizierten Igel über 800 g wogen. Bei einem untergewichtigen Igel mit starkem Zeckenbefall sollte daher immer eine Behandlung mit einem Antibiotikum (z.B. Doxycyclin) in Betracht gezogen werden, um einerseits den Igel zu therapieren, aber auch um andererseits den epidemiologischen Zyklus von Borrelien zu unterbrechen.

### **Igel als Borrelien-Reservoir während der Winterzeit?**

Es ist nicht genau bekannt, ob Igel während der Dauer ihres Winterschlafes als Borrelienreservoir fungieren. Im Zuge des Winterschlafes kommt es zu gravierenden physiologischen Veränderungen, u.a. zu einer starken Herabsetzung der Körpertemperatur und des Immunsystems (Prendergast et al. 2002).

Obwohl die Funktion des Immunsystems winterschlafender Tiere bisher wenig untersucht

wurde, wird angenommen, dass zellvermittelte und humorale Abwehrmechanismen gegen verschiedene Pathogene stark herabgesetzt sind (Prendergast et al. 2002).

Die Immunglobuline des Igels lassen sich in 3 Klassen einordnen: IgA, IgM, IgG. Das IgG wird zusätzlich in 2 Subklassen (IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2</sub>) unterteilt (Vaerman & Heremans 1971, Larsen 1972 a, b, 1973). Larsen (1972 a) stellte ein rapides Absinken der Immunglobuline während der Winterschlafperiode fest, was er einerseits auf eine verminderte Antikörpersynthese zurückführte, aber auch auf einen gleichzeitigen, wenn auch verzögerten Abbau vorhandener Immunglobuline. Die Normalkonzentration wurde nach dem Winterschlaf und der Aufwachphase rasch wieder erreicht. Als mögliche Ursache dafür wird eine Speicherung von Antikörpern in Plasmazellen oder Lymphozyten oder ein Vorhandensein von antigen wirkenden Substanzen im Futter vermutet (Berns et al. 1983).

Franceschi et al. (1972) beschreiben eine funktionelle Beeinträchtigung des Retikulo-Endothelialen Systems und der Leukozyten bei winterschlafenden Igel. Die höchste Sterblichkeitsrate kann zu dieser Jahreszeit bei Igel beobachtet werden. In einer Langzeitstudie in Schweden lag die Mortalität von adulten Tieren zwischen 26 % und 43 % (durchschnittlich 33 %) und für juvenile Tiere zwischen 6 % und 94 % (durchschnittlich 33 %) (Kristiansson 1990). Es gibt aber bisher keine Untersuchungen darüber, wie sich die Immunabwehr eines Individuums bei einer akuten Infektion im Winterschlaf verhält.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei einem Igel im Dezember eine Mischinfektion von *Borrelia bavariensis* und *B. spielmanii* in den Organen nachgewiesen werden. Bei einem anderen Tier war der Organpool sowie die Niere im Januar in der 5S23S rDNA-PCR positiv, die Borrelien konnten aber nicht weiter charakterisiert werden. Dieses Ergebnis beweist, dass auch in den Wintermonaten *Borrelia*-infizierte Tiere überdauern, was für eine Aufrechterhaltung des *Borrelia*-Zyklus durch Igel, unabhängig von der Saisonalität von *Ixodes ricinus*, spricht.

Finkbeiner-Weber (1996) zeigte, dass ein im Spätjahr auf Borrelien positiv getesteter Igel frühzeitig aus dem Winterschlaf erwachte und sein Allgemeinbefinden hochgradig gestört war. Dieses Tier starb kurz danach und die Hautbiopsie wurde als *Borrelia*-positiv befundet.

Einen weiteren Faktor für Morbidität und Mortalität von Igel während des Winters stellen möglicherweise auch die Zecken (insbesondere *Ixodes hexagonus*) dar, die im Nest überwintern. Die Zecken saugen bei einem winterschlafenden Igel nicht, da die Körpertemperatur auf ca. 6°C erniedrigt ist (Reeve 1994). Mit steigender Temperatur und dem Wiedererwachen im Frühjahr steht den Zecken, die im Nest überwintert haben, aber

unmittelbar ein Blutlieferant zur Verfügung. Problematisch wird es, wenn Igel durch ein schlechtes Allgemeinbefinden, aufgrund eines schlecht isolierten Nestes, durch Temperaturschwankungen oder durch Störung vorzeitig aus dem Winterschlaf erwachen. Untergewichtige Igel wachen des Öfteren während des Winterschlafs auf und verlassen ihr Nest für die Futtersuche (Reeve 1994). Dies ist mit einem enormen Energieaufwand verbunden und kann in Kombination mit anderen Stressoren (z.B. extreme Kälte, Wurm- oder Bakterienbefall) tödlich verlaufen. Im Winter aktive Igel, die von Findern in die Igelstationen gebracht werden, sind häufig mit vielen *I. hexagonus* Stadien befallen (Mrohs 2011). Diese Zeckenart kann also auch in der Winterzeit an der Aufrechterhaltung von Pathogen-Wirtstier-Zyklen beteiligt sein.

### 5.1.2.2 Verteilung und Differenzierung der *Borrelia*-Genospezies

#### Im Organgewebe

Vor dieser Untersuchung war nicht bekannt, in welchen Organen Borrelien bei Igeln lokalisiert sind. Die Verwendung eines Organpools eignete sich daher hervorragend als Screeningmethode. Bei der nachfolgenden Testung der Einzelorgane infizierter Igel wurde *Borrelia*-DNA lediglich im Blasen-, Nieren- und Herzgewebe nachgewiesen, im Lungen-, Milz- und Lebergewebe dagegen nicht.

Bei experimentell infizierten Mäusen erwies sich die Blase als effektivstes Organ für den Nachweis von Borrelien (94 %), gefolgt von Niere (75 %) und Milz (61 %) (Schwan et al. 1988). Bei natürlich infizierten Mäusen waren Blase und Milz gleichermaßen gut für den Nachweis geeignet, gefolgt von Nierengewebe und Blut (Callister et al. 1989). Da diese Arbeiten in Nordamerika durchgeführt wurden, handelte es sich vermutlich um *B. burgdorferi* s.s.. Zu beachten ist auch, dass bei den Arbeiten von Schwan et al. (1988) und Callister et al. (1989) die Borrelien aus den Organen in speziellem Kulturmedium angezüchtet und mittels Dunkelfeldmikroskopie nachgewiesen wurden. Daher sind sie nicht unbedingt mit den heutigen PCR-Nachweisen zu vergleichen. Auf PCR-Techniken basierende Untersuchungen zeigen, das Blasengewebe bei verschiedenen Nagetieren am besten für den Nachweis von Borrelien (insbesondere von *B. afzelii*) geeignet ist (Petney et al. 1996, Turk et al. 2008).

Obwohl *Borrelia afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* im Herz-, Nieren- und Blasengewebe detektiert wurden, stellte *B. afzelii* die dominierende Genospezies,

insbesondere im Blasengewebe, dar. Im Herzgewebe folgte an zweiter Stelle *B. bavariensis*, im Nierengewebe hingegen *B. spielmanii*. Obwohl sich diese Unterschiede nicht als signifikant erwiesen, könnte dieses Ergebnis auf einen Organotropismus der einzelnen Arten hindeuten. Die Hypothese des Organotropismus wurde von mehreren Autoren aufgrund signifikanter Korrelationen zwischen der jeweiligen Genospezies und des Erkrankungsbildes aufgestellt: *B. afzelii* ist bei Menschen primär mit Hauterkrankungen, *B. garinii* (und *B. bavariensis*) mit Neuroborreliosen und *B. burgdorferi* s.s. mit arthritischen Erkrankungsformen assoziiert (Van Dam et al. 1993, Balmelli & Piffaretti 1995, Baranton & De Martino 2009, Strle & Stanek 2009). Insbesondere *B. bavariensis* ist für den Verlauf von schwerwiegend verlaufenden Neuroborreliosen verantwortlich (Marconi et al. 1999). Über die Organpräferenz von *B. spielmanii* ist bisher wenig bekannt: bei menschlichen Infektionen konnte *B. spielmanii* bisher nur aus Hautgewebe (*Erythema migrans*) isoliert werden (Maraspin et al. 2002, Földvari et al. 2005, Fingerle et al. 2008). Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, findet in Igel die Infektion mit *B. spielmanii* nicht nur lokal in der Haut statt, sondern äußert sich auch in einer Organmanifestation.

Zu berücksichtigen ist, dass manche *Borrelia*-Stämme innerhalb einer Genospezies eine hohe Heterogenität aufweisen, und dadurch unterschiedlich pathogen und invasiv sind. Die meisten *B. afzelii* Stämme sind beispielsweise für Hauterscheinungen verantwortlich, dennoch gibt es auch *B. afzelii* Isolate, die aus der Synovialflüssigkeit oder aus der Zerebrospinalflüssigkeit von Patienten stammen (Vasiliiu et al. 1998, Strle et al. 2006).

Bei der Sequenzierung der Igelproben wurde bei allen *B. afzelii* Isolaten ein Basenaustausch an derselben Stelle festgestellt, was auf einen spezifischen *B. afzelii* Stamm in Igel hindeutet. Bei den beiden anderen Genospezies waren einzelne Basenunterschiede unterschiedlich lokalisiert. Ob es sich bei den Genospezies in Igel um humanpathogene Stämme handelt, muss durch eine Analyse weiterer Genorte (z.B. des *OspC* Gens) überprüft werden.

Im Körper einzelner Igel traten bei der vorliegenden Untersuchung gleichzeitig mehrere Genospezies auf. Als mischinfiziert wurde ein Tier dann angesehen, wenn in seinen einzelnen Organproben unterschiedliche *Borrelia*-DNA gefunden wurde.

Die DNA-Konzentration der einzelnen Genospezies kann im Probenmaterial bei Mischinfektion unterschiedlich hoch sein. Dabei kann eine Genospezies dominieren, weshalb es teilweise neben einem gut ausgeprägten Peak auch zu schwachen oder schlecht darstellbaren Peaks in der Schmelzpunktanalyse kommen kann. In der *OspA*-PCR auf dem

LightCycler zeigten *B. afzelii*-haltige Igelproben generell eine starke Fluoreszenz. Es könnte daher sein, dass *B. afzelii* andere Genospezies in einem Organ überlagerte oder diese nur in geringer Konzentration (unterhalb der Nachweisgrenze) vorlagen. Auch bei angezüchteten Mischisolaten aus Zecken überwächst *B. afzelii* häufig andere Genospezies, wie z.B. *B. bavariensis* in Kultur (Hu et al. 2002). Dies ergäbe eine Erklärung, weshalb manche Isolate in der Sequenzierung starke Überlagerungen zeigten.

2 in der 5S23S rDNA-PCR positive Proben konnten weder in der OspA-PCR noch in der Sequenzierung charakterisiert werden. Auch in anderen Studien können *Borrelia*-Isolate aus Wirtstieren und Zecken teilweise keiner Genospezies zugeordnet werden, weshalb vermutlich noch weitere bisher unbekannte Genospezies existieren (Kisinja et al. 2003, Rauter & Hartung 2005, Casjens et al. 2011).

Eine weitere Möglichkeit zur Artdifferenzierung und Detektion von Mischinfektionen in einer Probe stellt die OspA-RFLP-Analyse nach Michel (2003) dar, bei der das positive PCR-Produkt mithilfe eines Restriktionsverdau in verschiedene Fragmente geschnitten wird, deren Bandenmuster für jede *Borrelia*-Genospezies spezifisch ist. 5 DNA-Extraktionen von einzelnen Igelorganen, die in der OspA-PCR auf dem LightCycler 2 Peaks und in den Elektropherogrammen stark überlagerte Basen aufwiesen, wurden zur Durchführung einer RFLP-Analyse nach Michel et al. (2003) an Herrn Dr. V. Fingerle (LGL Oberschleißheim) geschickt. Dabei stellten sich die Igelorgane als ungeeignet für dieses PCR-System heraus, da keine bzw. nur unspezifische Banden auf dem Gelbild sichtbar waren (Dr. V. Fingerle, persönliche Mitteilung).

### **Geografische Verbreitung der Genospezies in Assoziation mit Reservoirwirten**

Die Verteilung und Häufigkeit der verschiedenen Genospezies unterliegt starken geografischen und regionalen Schwankungen und ist an das Vorhandensein von Reservoirwirten gebunden.

Die Spezialisierung der Genospezies auf bestimmte Reservoirwirte wird auf einen Selektionsprozess während der Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg zurückgeführt (Kurtenbach et al. 1998 b, 2006, Bhide et al. 2006, Skotarczak 2009).

Resistente Genospezies entgehen diesem Mechanismus der angeborenen Immunabwehr, indem sie durch spezielle Oberflächenproteine (z.B. Erp-Proteine und CRASP-Proteine) die Komplementregulatoren des jeweiligen Wirbeltierwirtes an ihre Oberfläche binden (Alitalo et

al. 2001, Von Lackum et al. 2005, Kurtenbach et al. 2006, Herzberger et al. 2009). Die Komplementregulatoren sind dazu fähig, die Komplementaktivierung zu inhibieren, wodurch resistente Borrelien nicht lysiert werden. Sensitive *B. burgdorferi* s.l. Stämme, die diese Komplementregulatoren nicht aus dem Serum adsorbieren können, werden durch die Komplementkaskade häufig schon im Mitteldarm der saugenden Zecke, nachdem sie in Kontakt mit dem Wirtstierblut gekommen sind, zerstört (Kurtenbach et al. 1998 b, 2002, 2006). Die Erp-Proteine zeigen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den Komplement-Regulatoren der jeweiligen Wirbeltierspezies (Stevenson et al. 2002). Es wird daher angenommen, dass das genetische Repertoire der einzelnen *Borrelia burgdorferi* s.l. Stämme, an Komplementregulatoren und andere Bestandteile des Komplementsystems zu binden, entscheidend die Wirtstierassoziation beeinflusst (Stevenson et al. 2002, Kurtenbach et al. 2002 a, b, 2006).

Die meisten *B. afzelii* Stämme zeigen sich beispielsweise gegenüber dem Komplement-System von Nagern resistent, werden allerdings durch das Komplement-System von Vögeln zerstört. In umgekehrter Weise verhält es sich mit *B. valaisiana* und den meisten *B. garinii* Stämmen. Je nach Wirtstierart werden also die Genospezies unterschiedlich stark vom Komplementsystem beeinflusst. Sogar Stämme innerhalb einer Genospezies können eine unterschiedliche Absterberate bei Inkubation mit demselben Wirtstierserum zeigen (Bhide et al. 2006). Wie der Organbefall beweist, sind die gefundenen Genospezies (*B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii*) gegenüber der Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg bei Igel resistent.

Basierend auf der Wirtstierzusammensetzung kann aufgrund der beschriebenen selektiven Mechanismen die Zusammensetzung der Genospezies auch innerhalb von sehr kleinflächigen Untersuchungsgebieten starken Schwankungen unterworfen sein (Khanakah et al. 2006, Schwarz et al. 2009). Auch in Abhängigkeit von der Jahreszeit und der geografischen Lage existieren erhebliche Unterschiede in Bezug auf Transmission und Prävalenz von *B. burgdorferi* s.l. in Wirtstieren, was sich auch in der *Borrelia*-Prävalenz in verschiedenen Entwicklungsstadien der Zecken widerspiegelt (Gray et al. 1992, Kahl et al. 1992, Kurtenbach et al. 1995, Kampen et al. 2004 b, Maetzel et al. 2005, Ostfeld et al. 2006).

In der vorliegenden Studie konnte *B. afzelii* am häufigsten im Gewebe von Igel nachgewiesen werden. In Deutschland gilt *B. afzelii* als die häufigste Genospezies (Schaarschmidt et al. 2001, Maetzel et al. 2005). Von Oehme et al. (2002) wurden in Baden-Württemberg die höchsten Infektionsraten für *B. afzelii* (37 %), gefolgt von *B. garinii* (22 %), *B. valaisiana* (14 %) und *B. burgdorferi* s.s. (10 %) in Patientenzecken ermittelt.

*B. afzelii* wird in epidemiologischen Zyklen vorrangig durch kleine Nagetiere wie Wald- und Gelbhalsmäuse verbreitet (Hu et al. 1997, Humair et al. 1995, 1999).

Fingerle et al. (2008) fanden in Deutschland in wirtssuchenden Zecken jedoch eine erhöhte Infektionsrate der Zecken mit *B. garinii* (34,3 %) gegenüber *B. afzelii* (25,1 %). Bei vielen Studien wurden allerdings nicht die OspA-Serotypen von *B. garinii* differenziert. Basierend auf einer Metaanalyse, bei der 110 Studien zur Durchseuchung von *I. ricinus* in Europa zusammengefasst wurden, waren *B. afzelii* und *B. garinii* die häufigsten Genospezies auf dem Festland (Rauter & Hartung 2005).

Interessanterweise lässt sich dieses Muster aber nicht auf Großbritannien übertragen: Kurtenbach et al. (1998) konnten dort nur das Zirkulieren von *B. garinii*, *B. valaisiana* und *B. burgdorferi* s.s. beobachten, während *B. afzelii*, eine der häufigsten Genospezies auf dem europäischen Kontinent, nicht nachgewiesen werden konnte. Ein Risiko für die Einschleppung von Pathogenen nach Großbritannien stellen möglicherweise Zugvögel dar, weshalb im Vereinigten Königreich vor allem das Zirkulieren von vogelspezifischen *Borrelia*-Arten, bzw. Arten mit einer weniger ausgeprägten Wirtstierassoziation, wie beispielsweise *B. burgdorferi* s.s., begünstigt sein könnte.

Erst kürzlich wurden allerdings auch verschiedene *B. afzelii* Stämme in wirtssuchenden Zecken in mehreren Untersuchungsgebieten in Süd-England detektiert (Vollmer et al. 2011). In den schottischen Highlands sind *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* die vorherrschenden Genospezies in wirtssuchenden Zecken (Ling et al. 2000). In dieser Region ist das Auftreten der Zeckenart *I. ricinus* durch das vermehrte Vorkommen ihrer definitiven Wirte, Schafe und Rehwild und den klimatischen Bedingungen stark begünstigt (Kirby et al. 2004).

Obwohl *B. garinii* in wirtssuchenden Zecken fast genauso häufig wie *B. afzelii* vorkommt (Schlee 2005), wird diese Genospezies in abgesammelten Zecken von Nagetieren relativ selten nachgewiesen. Die meisten *B. garinii*-Stämme werden durch Vögel verbreitet (Kurtenbach et al. 2006). Nur der epidemiologische Zyklus des OspA-Serotyps 4 (*B. bavariensis*) wird durch Nagetiere aufrecht erhalten. Dabei tragen vor allem Mäuse der Gattung *Apodemus* zur Verbreitung von *B. bavariensis* bei und sind daher in besonderem Maße als Reservoirwirte geeignet (Hu et al. 2001, Huegli et al. 2002). Andere Mäusearten infizieren Zecken nur selten mit dieser Genospezies. Es wurde bisher vermutet, dass das Vorkommen von *B. bavariensis* insbesondere auf den süddeutschen Raum mosaikartig begrenzt ist, da *B. bavariensis* in wirtssuchenden Zecken im übrigen Deutschland nur sehr selten gefunden wird (Michel et al. 2003, Kipp 2008, Hildebrandt et al. 2010). In Polen und

der Slowakei zeigte sich dagegen eine flächendeckende Verbreitung (Lencáková et al. 2006). Die Tatsache, dass insgesamt 13 von 37 Igel mit *B. bavariensis* infiziert waren, häufig als Mischinfektion mit *B. afzelii*, deutet darauf hin, dass *Erinaceus*-Arten ähnlich wie *Apodemus*-Arten eine wichtige Rolle in der Epidemiologie dieser Genospezies einnehmen. Die Igel stammten nicht nur aus dem süddeutschen Raum, sondern auch aus weiter nördlich gelegenen Gebieten, was auch in Deutschland für eine flächendeckende Anwesenheit dieser Genospezies spricht. Möglicherweise zeigt *B. bavariensis* eine stärkere Wirtsassoziation als andere Genospezies und wird daher nur in Habitaten gefunden, in denen auch *Apodemus*- und *Erinaceus*-Arten präsent sind.

Auch im Kreislauf von *B. spielmanii* nimmt der Igel eine wichtige Funktion ein. Zuvor galten Vertreter der Bilche, auch Schläfer oder Schlafmäuse genannt (Gliridae), wie Gartenschläfer (*Eliomys* spp.) und Haselmäuse (*Muscardinus* spp.) als hauptsächliche Reservoirwirte für diese Genospezies (Schlee 2005, Richter et al. 2004 a, 2006). In Wald- und Rötelmäusen, die oft Zecken mit *B. afzelii* infizieren, wurde *B. spielmanii* bisher noch nicht gefunden (Richter et al. 2004 b). Angesichts der hohen Prävalenzen (8 der 37 infizierten Tiere hatten eine nachweisliche *B. spielmanii* Infektion) könnte auch der Igel maßgeblich an der Epidemiologie von *B. spielmanii* beteiligt sein. Möglicherweise wird *B. spielmanii* nicht durch einen sylvatischen Zyklus, sondern primär durch einen urbanen epidemiologischen Kreislauf verbreitet. Sowohl Fingerle et al. (2008) als auch Strube et al. (2010) fanden in *I. ricinus* sehr hohe Prävalenzen von *B. spielmanii* innerhalb städtischer Parkanlagen, wie z.B. dem Englischen Garten oder in einem Erholungsgebiet im Stadtbereich von Hannover. In suburbanen und urbanen Gebieten ist der für Igel nutzbare Lebensraum stark eingeschränkt und konzentriert sich daher auf klar abgrenzbare Bereiche, wie Parkanlagen, Friedhöfe, Schrebergartenanlagen oder größere Grünflächen (Esser 1984, Zingg 1994). In diesen Gebieten könnte das Infektionsrisiko mit *B. spielmanii* durch Igel für den Menschen erheblich erhöht sein.

*B. spielmanii* konnte aus Igel aus Baden-Württemberg, Rheinland-Pfalz, Hessen und Hamburg isoliert werden. In Hamburg war das Auftreten dieser Genospezies bis dato noch nicht bekannt. Bisher schien das Vorkommen von *B. spielmanii* in Deutschland auf lokale Gebiete vor allem im süddeutschen Raum begrenzt zu sein (Rauter et al. 2002, Fingerle et al. 2008). Allerdings wurde *B. spielmanii* in *Ixodes hexagonus* vor Kurzem auch in Niedersachsen nachgewiesen (Strube et al. 2010).

Ein wichtiges Verbreitungsgebiet dieser Genospezies erstreckt sich möglicherweise entlang

des Rheins. *B. spielmanii* wurde unter anderem in Igel und deren Zecken aus Steinfeld in der Nähe des Bienwaldes (Rheinland-Pfalz), der ca. 30 km westlich von Karlsruhe liegt, gefunden. In den Untersuchungen von Schlee (2005) wurde diese Art in Gartenschläfern und *I. ricinus* im französischen Ort Lembach (Elsass) nachgewiesen. Dieser Ort ist nur ca. 20 km von Steinfeld entfernt.

Analog zu bisherigen Untersuchungen in Kleinsäugetieren konnten die vogelspezifischen *B. garinii*-Varianten und *B. valaisana* in Igel nicht detektiert werden. Ebenso wurde molekularbiologisch bei keinem Igel eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.s. detektiert und nur bei einem Tier serologisch anhand des p18-Proteins festgestellt. In epidemiologischen Studien zeigte sich, dass das Vorkommen von *B. burgdorferi* s.s. in Europa stark variiert und diese Genospezies in Westeuropa allgemein eher selten anzutreffen ist (Rauter et al. 2002, Hildebrandt et al. 2003, Fingerle et al. 2004, Kampen et al. 2004 b, Rauter & Hartung 2005). Je nach Untersuchungsgebiet können aber auch hohe Prävalenzen von *B. burgdorferi* s.s. von bis zu 22 % in Deutschland erreicht werden (Oehme et al. 2002, Maetzel et al. 2005, Fingerle et al. 2008).

In früheren Untersuchungen wurden bereits Borrelien in Igel gefunden, ohne dass diese bis zur Genospezies differenziert wurden (Finkbeiner-Weber 1996). Gern et al. (1997) kultivierten Ohr- und Hautbiopsien von Igel in BSK II Medium und wiesen in der anschließenden PCR erstmalig die Arten *B. garinii*, gefolgt von *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. in dieser Tierart nach. Auch eine Mischinfektion mit *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii*, konnten diese Autoren in der Haut von Igel ermitteln. Da in der vorliegenden Untersuchung weder molekularbiologisch noch serologisch vogelassoziierte *B. garinii*-Varianten gefunden wurden, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Isolaten von Gern et al. (1997) ebenfalls um *B. bavariensis* gehandelt hat.

Ein molekularbiologischer Nachweis in Organen besagt, dass Tiere für die Infektion empfänglich sind (Gern et al. 1998). Eine Infektion muss aber nicht zwangsläufig zur Krankheit führen, sondern verläuft in vielen Fällen symptomlos und macht sich nur durch das Auftreten von Antikörpern bemerkbar.

Die PCR-Ergebnisse der untersuchten Organproben lassen keine Rückschlüsse zu, ob es sich um vitale Borrelien handelt. Hierfür wäre eine Anzucht in speziellen Nährmedien nötig gewesen, die aber nur unter hohem Zeit- und Kostenaufwand durchgeführt werden kann. Auch geben die PCR-Ergebnisse keinen Aufschluss darüber, ob die Borrelieninfektion zum

---

Tod des Tieres führte. Um eine Aussage hinsichtlich einer möglichen Pathogenität der gefundenen Isolate für den Menschen und andere Tiere zu treffen, müssen die aus Igel isolierten Genospezies einer umfassenden Charakterisierung unterzogen werden.

### 5.1.2.3 Serologischer Nachweis

#### 5.1.2.3.1 *Borrelia burgdorferi* s.l. ELISA

Der Antikörpernachweis gegen Borrelien wurde mithilfe eines kommerziellen rekombinanten *Borrelia*-ELISA-Kits und einem daran adaptierten Protein G-Peroxidase-Konjugat durchgeführt. Wie sich bei der Untersuchung herausstellte, reagierte Protein G als universell einsetzbares „all species“-Konjugat mit dem Fc-Terminus des IgG im Igelserum, sodass kein spezifisches anti-Igel-Konjugat aufwändig produziert werden musste. Verschiedene Wirbeltierspezies aus zoologischen Gärten wurden von Stöbel et al. (2002) auf diese Weise auf *Borrelia burgdorferi* s.l. untersucht. Obwohl Protein G teilweise für serologische Fragestellungen bei verschiedenen domestizierten Tieren und Labortieren verwendet wurde (Björck & Kronvall 1984, Kelly et al. 2002), gibt es bisher nur sehr wenige Berichte bei wild lebenden Kleinsäugetern. Erstmals überhaupt wurden Igel auf diese Weise serologisch getestet. Mit Peroxidase gekoppeltes Protein G wurde auch von Lee et al. (2003) zur Detektion von spezifischen Antikörpern gegen Hantaviren in Nagetieren verwendet. Die Autoren weisen ausdrücklich darauf hin, dass es zu unspezifischen Kreuzreaktionen kommen kann und der zweite Antikörper (Konjugat) für jede Nagerspezies im Vorfeld auf die Eignung in serologischen Testsystemen zu überprüfen sei. Die im ELISA als positiv befundenen Igelseren konnten auch durch einen Immunblot bestätigt werden, was zeigt, dass die Durchführung des ELISAs funktionierte und nicht zu „falsch positiven“ Ergebnissen führte. Alle Seren der Igel aus dem „Igelgarten“ wiesen spezifische und sehr hohe Antikörpertiter gegen Borrelien auf. Dies ist nicht verwunderlich, da eine ständige Zeckeninfestation dieser Tiere unter natürlichen Bedingungen zu beobachten war (Pfäffle et al. 2011). Im Vergleich zum „Igelgarten“ wurden viele Seren aus Igelstationen als *Borrelia*-negativ eingestuft. In Igelstationen werden sowohl Igelsäuglinge als auch kranke, verletzte und untergewichtige Igel aufgenommen, weshalb eine starke Inhomogenität hinsichtlich des Alters und des Gesundheitszustandes der aufgenommenen Igel bestehen kann. In den Igelstationen aus Hessen und Baden-Württemberg gab es viele Igel, die als Säuglinge von Hand aufgezogen wurden und somit noch keinen Kontakt zu Borrelien gehabt hatten.

### 5.1.2.3.2 *Borrelia burgdorferi* s.l. Immunblot

Der kommerzielle Immunblot in Verbindung mit dem Protein G-Peroxidase-Konjugat eignet sich zum Nachweis von IgG-Antikörpern im Igelblut und zur Bestätigung eines positiven ELISA-Ergebnisses. Durch die Verwendung von rekombinanten Testantigenen und des VlsE-Proteins konnten die Sensitivität und Spezifität bei diesem kommerziellen Immunstreifen stark erhöht werden (Göttner et al. 2005). Eine Studie des Max-von-Pettenkofer-Institutes (Referenzzentrum für Borrelien) zeigte, dass durch eine zusätzliche Bestimmung der Antikörper gegen VlsE die Spezifität gegenüber Immunblots mit Vollextrakt um 20 % und gegenüber Immunblots mit rekombinanten Antigenen ohne VlsE um 30 % gesteigert werden konnte (Schulte-Spechtel et al. 2003, Wilske 2003).

Bei den ursprünglichen Testsystemen wurden u.a. Volllysate von Borrelienkulturen verwendet, woraus oft Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen *Borrelia*-Genospezies resultierten. Anhand der rekombinant hergestellten p18-Antigene lässt sich erkennen, dass Kreuzreaktionen zwischen den Genospezies bei Igelseren weitgehend ausgeschlossen werden können. Die p18-Banden reagierten sehr spezies-spezifisch mit den gegen sie gerichteten Antikörpern im Igelblut. Kein Igel wies Antikörper gegen die vogelspezifische *B. garinii*-Variante auf. Dagegen zeigten fast alle der positiv getesteten Igel sehr hohe Antikörperspiegel gegen *Borrelia bavariensis* und *B. afzelii*, vereinzelt auch gegen *B. spielmanii*. Lediglich bei 2 Igeln konnten Reaktivitäten (nur bei einem Igel im positiven Wertebereich) gegen das p18-Protein von *B. burgdorferi* s.s. nachgewiesen werden. Diese Befunde decken sich daher sehr gut mit den molekularbiologischen Ergebnissen.

Da in der vorliegenden Studie tierische Seren verwendet, und das „all species“-Konjugat an einen humanmedizinischen Immunblot angepasst wurden, unterlag die Ergebnisinterpretation der Igelseren nicht den strengen Richtlinien wie in der Humanmedizin. In einer aktuellen Studie von Mavin et al. (2011) wurden menschliche Immunblots von 3688 Patienten analysiert und eine neue Ergebnisinterpretation entwickelt, bei der ebenfalls mehr Seren im Immunblot als positiv bestätigt werden konnten, als zuvor. Bei Igeln wurden Seren als positiv bewertet, wenn sie mit mindestens einem Punkt in der Wertetabelle aufgeführt waren.

Dennoch gestaltete sich die Interpretation der Bandenmuster für einzelne Igel schwierig. Oft war die Vorgeschichte der Igel unklar, auch die Zeckenexposition/Expositionsdauer konnte nicht nachvollziehbar angegeben werden. Anhand des Körpergewichtes, des Zahnzustandes und der Stachelfärbung wurden die Igel in 3 Kategorien (juvenil, subadult, adult) eingeteilt.

Ein genaues Alter bei mehrjährigen Tieren lässt sich nur anhand der Kieferknochen bei toten Tieren ermitteln (Reeve 1994). Die vorberichtlichen Daten für jeden Igel konnten daher nur näherungsweise angegeben werden. Mithilfe des verwendeten „all species“-Konjugates konnten nur IgG-Antikörper, keine IgM-Antikörper detektiert werden, die für eine konkrete Aussage über eine Infektion im frühen Stadium nötig gewesen wären.

Die Reaktivitäten der Igelseren gegen die einzelnen *Borrelia*-Antigene fielen individuell sehr unterschiedlich aus. Am häufigsten wurden IgG-Reaktivitäten gegen VlsE gefolgt von p39, p18 (*B. bavariensis*), p100 und p18 (*B. afzelii*) ermittelt. Hinsichtlich der mittleren Intensitäten der Reaktivitäten zeigte das VlsE-Antigen ebenfalls die höchsten Werte, gefolgt von p100, p18 (*B. bavariensis*) und p18 (*B. afzelii*). Hofmann (1996) merkt an, dass die Antikörperdetektion von Borrelien bei infizierten Patienten unterschiedlich ausfallen kann und in Abhängigkeit des Infektionsstadiums stark variiert. Meist kommt es zu einer zeitlich gestaffelten Antikörperbildung: zuerst erkennt das Immunsystem antigene Strukturen auf der Oberfläche wie z.B. p41 (Flagellin) und die „outer surface“-Proteine, im späteren Verlauf der Erkrankung dann intrazellulär gelegene Strukturen wie z.B. p100 (Hauser et al. 1999).

Die meisten Igelseren reagierten stark mit dem VlsE-Antigen, ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein aus verschiedenen humanpathogenen *B. burgdorferi* s.l. Stämmen. Dieses Oberflächenprotein wird von Borrelien nur in vivo exprimiert und besitzt von allen untersuchten Antigenen die höchste Sensitivität für den Nachweis einer Borrelien-Infektion (Schulte-Spechtel et al. 2003, Chmielewska-Badora et al. 2006). Ursprünglich wurde VlsE als Marker für eine aktive Borreliose angesehen; allerdings sind starke Reaktivitäten auch bei erfolgreich behandelten Patienten vorhanden und können somit nicht zur Unterscheidung einer aktiven oder bereits vergangenen Infektion herangezogen werden (Strle & Stanek 2009). Das VlsE trägt durch eine ausgeprägte Antigenvarianz dazu bei, dass sich Borrelien der Immunabwehr des Säugetierwirts entziehen und in immunabgeschiedenen Regionen des Körpers (z.B. Gelenke) überdauern können (Embers et al. 2007, Coutte et al. 2009, Tsao et al. 2009). Obwohl bereits juvenile Igel Reaktivitäten gegen VlsE zeigten, waren diese im Vergleich zu adulten Igeln signifikant erniedrigt. Hohe VlsE-Titer bei adulten Igeln deuten darauf hin, dass Borrelien durch ständige Veränderung ihrer Oberfläche dazu fähig sind, im Gewebe über einen längeren Zeitraum zu persistieren und sich der Immunabwehr aktiv zu entziehen.

Als weitere immundominante Proteine sind auf dem Blutstreifen die Oberflächenproteine OspA und OspC aufgetragen. Wie zu erwarten war, traten keine Banden gegen OspA auf. OspA-Antikörper werden nur sehr selten nach einer Infektion gebildet, sondern entstehen fast ausschließlich nach einer Impfung in hoher Konzentration und schützen vor einer erneuten Infektion (Fikrig et al. 1990, Gern et al. 1994, Sadziene & Barbour 1996, Probert et al. 1997). Sowohl in Igelseren aus Hamburg als auch aus dem „Igelgarten“ konnten gegen OspC gerichtete IgG-Antikörper detektiert werden. Im Anfangsstadium einer Infektion sind hohe IgM-Reaktivitäten gegen OspC detektierbar, aber des Öfteren auch starke IgG-Reaktivitäten (Theisen et al. 1993, Padula et al. 1994, Earnhart et al. 2005, Glatz et al. 2008).

OspC spielt eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Borrelien vom Zecken- auf den Säugetierwirt: Antikörper gegen dieses Protein werden vom Wirt daher insbesondere bei der frühen Immunantwort gebildet (Tilly et al. 2006). Die biologische Funktion dieses Proteins ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass die Expression von OspC Borrelien einerseits vor der angeborenen Immunabwehr des Säugetierwirts schützt, aber auch andererseits den Invasionsprozess und das Überleben im Wirt begünstigt (Earnhart et al. 2005, Radolf & Caimano 2008, Tilly et al. 2006, 2009). Antikörper gegen OspC schützen den Säugetierwirt gegen eine erneute Infektion mit derselben Borrelienart, zeigen aber keine Kreuzimmunität gegenüber anderen Genospezies (Probert et al. 1997).

Insbesondere in den Hamburger Igeln waren erhöhte OspC-Werte für *B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* vorhanden. Neben OspC sind in der frühen Phase auch häufig Antikörper gegen p41 und p39 gerichtet (Engstrom et al. 1995). In Verbindung mit den signifikant erhöhten p39-Werten liegt die Vermutung nahe, dass sich die Igel aus Hamburg erst kürzlich mit Borrelien infiziert hatten.

Die Aussagekraft der positiv reagierenden Seren gegen das Antigen p41 (Flagellin oder Geißelantigen) ist aufgrund von unspezifischen Reaktionen eingeschränkt (Smismans et al. 2006). Es zeigt u.a. Kreuzreaktionen mit anderen begeißelten Bakterien (Engstrom et al. 1995, Hauser et al. 1999). Insbesondere in Blutproben aus dem „Igelgarten“ waren hohe p41-Reaktivitäten detektierbar. Da Igel auch Infektionen mit Leptospiren entwickeln können (Broom et al. 1960, Riley & Chomel 2005), könnte dies ebenfalls eine Erklärung für die erhöhten p41-Reaktivitäten sein.

Das Protein p58 ist ein typischer IgG-Marker im Stadium III einer Borrelien-Infektion, aber auch im Stadium II bei Neuroborreliosepatienten (Hauser et al. 1999, Wilske et al. 2003, Göttner et al. 2005). 5 Tiere aus dem „Igelgarten“ zeigten erhöhte Reaktivitäten, aber keine neurologischen Ausfallsymptome. Bei einem juvenilen Igel aus Hamburg wurde eine Borreliose vermutet, da er eine komplette Lähmung der Hinterbeine zeigte, die durch Behandlung mit Doxycyclin verschwand (siehe Anhang, Abbildung 40, Serum 41). Dieser Igel zeigte aber keine Reaktivitäten gegen p58, sondern Reaktivitäten gegen VlsE (467,2), p41 (-49,6), p39 (51,3); OspC Bss (-41,2); OspC Bga (-3,4); OspC Bsp (-32,8) und p18 Baf (17,6). In einer Studie von Brunet et al. (1995) konnten in nahezu allen natürlich infizierten Mäusen Antikörper gegen p58 unabhängig von der Transmissionsintensität nachgewiesen werden. Inwieweit dieses Protein als Indikator eines Neuroborrelioseverdachts bei Igel zu Rate gezogen werden kann, muss weiter überprüft werden und kann nur in Verbindung mit einer umfangreichen Diagnosestellung verifiziert werden.

Das p39-Antigen gehört zu den immundominantesten und gleichzeitig hochspezifischen *Borrelia*-Markern (Simpson et al. 1991). Die höchsten p39-Reaktivitäten konnten in Hamburger Igel gefunden werden. Antikörper gegen p39 werden als Reaktion auf eine aktive Infektion gebildet und können im Serum schon nach wenigen Wochen in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Simpson et al. 1991). Wie bereits erwähnt, könnte es sich um eine erst kurz zurückliegende Infektion bei diesen Igel handeln. Eine starke humorale Immunantwort gegen p39 kann nur bei einer aktiven Infektion beobachtet werden: bei Injektion von inaktivierten oder lysierten Borrelien bildeten Mäuse keine Antikörper (Simpson et al. 1991). Im Gegensatz zu den Osp-Proteinen besitzt p39 keine protektive Wirkung für den Säugetierwirt (Simpson et al. 1991, Gilmore et al. 1996). Antikörper gegen p39 und p58 erschienen bei natürlich infizierten Weißfußmäusen bereits kurz nach der Infektion und wurden meist schon vor allen anderen Spirochäten-Antigenen gebildet (Brunet et al. 1995). Die humorale Antwort erfolgte schnell und die Mäuse, die eine Serokonversion entwickelten, zeigten eine lebenslange, sehr hohe Immunreaktivität gegen dieses Protein. p39-Antigenbanden lassen sich generell im gesamten Krankheitsverlauf nachweisen und bleiben in experimentell infizierten Labortieren, z.B. Mäusen, Hamstern und Meerschweinchen, langlebig bestehen (Brunet et al. 1995).

Für die Diagnostik von Spätstadium-Infektionen ist p100 besonders gut geeignet. Eine Immunreaktion gegen dieses Protein entsteht zwar in der Regel relativ spät im Verlauf der Erkrankung, es weist aber keine bekannten Kreuzreaktionen auf. Insbesondere in Hamburg kam es zu hohen p100-Reaktivitäten. Im „Igelgarten“, in dem mehrjährige Tiere kontinuierlich einer natürlichen Zeckenexposition ausgesetzt waren, konnten erstaunlicherweise im Vergleich zu Hamburg nur relativ niedrige durchschnittliche Reaktivitäten gegen p100 und das auch nur bei vergleichsweise wenigen Tieren festgestellt werden. Das p100-Protein auf dem verwendeten Teststreifen stammte von *B. afzelii*. Möglicherweise resultiert aus einer erfolgten Immunisierung gegen *B. afzelii* ein stetiger Rückgang von p100-Antikörpern. Generell werden p100-Antikörper nur sehr langsam abgebaut und können zeitlebens bestehen bleiben. In der Humanmedizin treten sie vor allem bei Patienten mit einer ausgeheilten Borrelien-Infektion („Seronarbe“) auf (Burkert et al. 1996, Haes 2003).

Zusammenfassend kann das Bandenmuster eines Blotstreifens individuell sehr unterschiedlich ausfallen und sich im Laufe der Infektion verändern (Hauser et al. 1999). Chronisch infizierte Mäuse zeigten Reaktivitäten gegen ein großes Spektrum an *Borrelia*-Antigenen (Brunet et al. 1995). Auch bei adulten Igel ist eine breite Reaktion gegen verschiedene *Borrelia*-Antigene zu erkennen.

#### **5.1.2.4 *Borrelia burgdorferi* s.l. in gesaugten Zecken**

Ein allgemeines Transmissionsmodell von Anderson & May (1991) geht davon aus, dass in Populationen häufig eine aggregierte Verteilung hinsichtlich der Infestation oder Erkrankung festzustellen ist; d.h. wenige Individuen sind schnell, häufig oder stark mit einem Erreger infiziert, während die Mehrheit der Population nur gering oder gar nicht infiziert ist. Die 20/80 Regel besagt in diesem Zusammenhang, dass 20 % der Individuen einer Population 80 % der Parasiten/Erreger beisteuern (Woolhouse et al. 1997).

Diese Regel lässt sich auch annähernd auf die Infektionsrate der von Igel abgesammelten Zecken, insbesondere bei Borrelien, anwenden. Nur auf 7 von 33 Igel (21,21 %) konnten *Borrelia*-positive Zecken entdeckt werden. Dabei erwiesen sich meist nur 1 bis 2 Zecken als positiv. Von *Ixodes hexagonus* waren insgesamt nur 3 Weibchen (2 *B. afzelii*, 1 *B. bavariensis*) und 1 Nymphenpool (*B. afzelii*) infiziert. Die Prävalenz in *I. hexagonus* scheint generell eher niedrig zu sein. Nijhof et al. (2007) konnten keine Erreger des *B. burgdorferi* s. l. Komplexes

in 137 untersuchten *I. hexagonus* nachweisen. In einer Studie von Liebisch & Olbrich (1991) konnte eine Infektionsrate in nüchternen Igelzecken von 3-7 % ermittelt werden. Finkbeiner-Weber (1996) befand in der Dunkelfeld-Mikroskopie nur 2,6 % von *I. hexagonus* als positiv. Ähnliche Prävalenzen errechneten auch Bernasconi et al. (1997). In einer aktuellen Studie von Strube et al. (2010) zeigten sich 5,7 % von 232 untersuchten *I. hexagonus* in der Real-time PCR positiv. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie waren diese ebenfalls mit *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. spielmanii* infiziert. Teilweise können aber auch sehr hohe Infektionsraten erreicht werden: in einem Untersuchungsgebiet in Spanien, in dem keine *Ixodes ricinus* Zecken gefunden wurden, waren bis zu 28 % der untersuchten *I. hexagonus* Weibchen infiziert (Estrada-Peña et al. 1995).

Bei *I. ricinus* waren neben 4 Weibchen auch 44 Nymphenpools und 11 Larvenpools positiv, was einer Mindestinfektionsrate der Stadien zwischen ca. 6 % und 15 % entspricht. Die Mindestinfektionsrate geht lediglich davon aus, dass mindestens eine Zecke pro Pool infiziert ist. Es ist daher nicht auszuschließen, dass noch mehrere Nymphen bzw. Larven in einem Pool positiv waren. Ein großer Anteil der positiven Nymphen- und Larvenpools stammte ausschließlich von einem Igel, bei dem zuvor auch *B. afzelii*, *B. spielmanii* und *A. phagocytophilum* in den Organen nachgewiesen werden konnten. Offenbar hatte dieses Tier eine akute Bakteriämie, was sich in der Vielzahl an positiven Zeckenpools (53/68 positiv), insbesondere auch von Larvenpools (11/13 positiv), bemerkbar machte. Der Igel war ausschließlich mit *I. ricinus* Stadien befallen.

Die stichprobenartig sequenzierten Zeckenpools zeigten starke Überlagerungen und waren zum größten Teil nicht auswertbar. Generell waren Amplifikate von vollgesogenen Zecken (insbesondere *I. ricinus*) der beiden gewählten PCR-Systeme schlecht sequenzierbar, möglicherweise aufgrund von vielfältigen Mischinfektionen. Die OspA-PCR auf dem LightCycler lieferte zwar Hinweise auf das Vorhandensein von *B. afzelii* und *B. spielmanii* in den untersuchten Zeckenpools, allerdings sollten zu einer eindeutigen Identifizierung von Mischinfektionen in vollgesogenen Zecken andere Nachweismethoden, wie z.B. die RFLP-Analyse, gewählt werden.

Bei einer Pilotstudie in Kooperation mit Dr. V. Fingerle (LGL Oberschleißheim) konnten 12 vollgesogene *Borrelia*-positive Weibchen (*I. ricinus*) von Igeln aus dem „Igelgarten“ nach dieser Methode näher charakterisiert werden: 5 Zecken zeigten eine Einzelinfektion mit *B. afzelii*, jeweils 2 Zecken Einzelinfektionen mit *B. bavariensis* und *B. spielmanii*, jeweils eine Zecke eine Mischinfektion von *B. afzelii/B. bavariensis* bzw. *B. afzelii/B. spielmanii* und

eine Zecke wies eine Infektion von *B. afzelii* und ein nicht auswertbares Bandenmuster auf (Dr. V. Fingerle, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Studie waren mehr *I. ricinus* als *I. hexagonus* Proben positiv. Möglicherweise geht von *I. ricinus* für den Igel ein höheres Infektionsrisiko aus als von *I. hexagonus*. Der Igel könnte an den Befall mit *I. hexagonus* durch die ausgeprägte Wirtsassoziation besser angepasst sein, als an den von *I. ricinus*. Im Speichel von Zecken befinden sich zahlreiche immunsuppressive Substanzen, die die Pathogenübertragung erleichtern (Mejri et al. 2002, Hannier et al. 2004, Kýcková & Kopecký 2006). Lawrie et al. (1999) zeigten, dass Extrakte aus Speicheldrüsen („salivary gland extract“, SGE) von *I. hexagonus* die Aktivierung des Komplements über den alternativen Weg beim Igel doppelt so stark inhibieren, wie SGE von *I. ricinus*. Dies müsste theoretisch bedeuten, dass Pathogene von *I. hexagonus* effektiver als von *I. ricinus* auf Igel übertragen werden. Allerdings könnte der Igel, bedingt durch den häufigen Befall mit der wirtsspezifischen Igelzecke, eine Immunität gegen die Speichelproteine von *I. hexagonus* entwickeln und somit vor der Pathogenübertragung, die von *I. hexagonus* ausgeht, geschützt sein. Mäuse, die aktiv mit dem Speichelprotein Salp15 immunisiert wurden, waren signifikant vor einer Infektion mit *B. burgdorferi* geschützt (Dai et al. 2009). In welcher Weise die niedrige Infektionsrate von *I. hexagonus* mit der möglichen Immunität von Igeln gegen Speichelproteine, bzw. gegen die Spirochäten selbst, in Verbindung steht, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

### **5.1.3 Experimentelle Untersuchung zur Übertragung von Borrelien**

#### **5.1.3.1 Experimentelle Infektion**

Bei allen 5 Igeln, die mit *B. afzelii*-infizierten *I. ricinus* Weibchen besetzt worden waren, konnte innerhalb der ersten beiden Monate nach dem *Borrelia*-Kontakt eine Serokonversion beobachtet werden. Auch bei einem ähnlichen Experiment von Kurtenbach et al. (1994), die Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*), Waldmäuse (*Apodemus sylvaticus*) und Rötelmäuse (*Myodes glareolus*) experimentell mit Borrelien infizierten, entwickelten alle Tiere, unabhängig von der Spezies, spezifische Antikörper gegen verschiedene *Borrelia*-Antigene. Allerdings zeigten Nager der Gattung *Apodemus* eine deutlich höhere Antikörperproduktion als Rötelmäuse, was für eine niedrigere Reservoirkompetenz spricht. Generell korreliert eine starke Immunantwort des Wirtstieres negativ mit der Transmissionsrate von Erregern auf Zecken (Mather et al. 1989, Kurtenbach et al. 1994, 2002, 2006, Levin & Fish 2000).

Obwohl den Versuchstieren zum selben Zeitpunkt *B. afzelii*-infizierte Zecken angesetzt worden waren, verlief die Entwicklung und Stärke des IgG-Antikörpertiters bei jedem Tier anders. Die Immunantwort auf Borrelien-Infektionen scheint daher bei Igel Individuell sehr unterschiedlich auszufallen.

Des Weiteren reichten 5 mit *B. afzelii*-infizierte Zeckenweibchen bei den Igel nicht aus, um eine symptomatische Erkrankung auszulösen. Weder ein Erregernachweis mittels PCR aus dem Blut noch ein Nachweis aus xenodiagnostischen Zecken gelang. Da es sich um 1,5-jährige Tiere handelte, war der Immunstatus möglicherweise schon so weit gefestigt, dass die Borrelien bereits beim Eintritt in die Haut lokal abgetötet wurden. Die zelluläre Abwehr hat vor allem in der Haut einen entscheidenden Einfluss auf die Eliminierung von Borrelien (Liang et al. 2004). Eventuell bestand die Infektion auch nur temporär lokal in der Nähe der Einstichstellen. Obwohl Finkbeiner-Weber (1996) bei einem Igel in unmittelbarer Nähe der Insertionsstelle einer Zecke Borrelien mittels Hautbiopsie nachweisen konnte, infizierte auch dieser Igel keine xenodiagnostischen Zecken.

Eine andere Erklärung könnte die Verwendung eines aus Nagern isolierten *B. afzelii* Stammes sein: möglicherweise war der verwendete *B. afzelii* Laborstamm nicht ausreichend infektiös für Igel oder zu niedrig dosiert. 5 infizierte *I. ricinus* Weibchen reichen für gewöhnlich aus, um bei Gerbilen im Labor eine nachweisbare Infektion mit diesem Stamm auszulösen (Dr. H. Dautel, persönliche Mitteilung).

### 5.1.3.2 Natürliche Infektion

Durch einen einwöchigen Aufenthalt im „Igelgarten“ erfolgte bei 6 Igel die natürliche Infektion mit *Borrelia burgdorferi* s.l.. Dabei handelte es sich um 4 Tiere, die langjährig im „Igelgarten“ gelebt hatten und 2 neu eingesetzte Tiere. Durch vorangegangene Untersuchungen von Zecken und Sektionsigel war bereits bekannt, dass dort in jedem Fall *Borrelia afzelii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis* natürlich zirkulieren.

Laut Skotarczak (2002) zeigen Wildtiere, die einem regelmäßigen, starken Zeckenbefall ausgesetzt sind, keine klinische Manifestation einer Borreliose. Dies wird auf eine Art „Balance“ des Parasiten-Wirts-Systems, das sich im Laufe der Evolution ausgebildet hat, zurückgeführt. In einzelnen Fällen kann sich aber dieses System auch zugunsten des Parasiten verschieben.

Bei einem subadulten Igel, der erstmalig in den „Igelgarten“ gesetzt wurde, kam es zu einer starken Zeckeninfestation, verbunden mit Symptomen eines gestörten Allgemeinbefindens

(Apathie, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit). Durch einen massiven Zeckenbefall und den damit verbundenen Blutverlust können Igel einerseits geschwächt werden (Pfäffle et al. 2009), aber auch andererseits Infektionserreger durch den Zeckenstich übertragen werden. Nach Entfernung der Zecken und durchgeführter Zwangsernährung erholte sich der Igel zusehends, infizierte aber, trotz unauffälligem Allgemeinbefinden, nach 3 Monaten noch 13 von 17 untersuchten xenodiagnostischen Zecken mit *B. afzelii* und *B. spielmanii*. Auch in der entnommenen Hautbiopsie dieses Tieres wurden diese beiden Genospezies zu diesem Zeitpunkt molekularbiologisch detektiert. Da die gesogenen Larven erst nach ihrer Häutung als nüchterne Nymphen molekularbiologisch untersucht wurden, gelang neben dem Nachweis der Reservoirkompetenz des Igels für *B. afzelii* und *B. spielmanii* auch gleichzeitig der Nachweis der transstadialen Erregerübertragung.

Über welchen Gesamtzeitraum dieser Igel für Zecken infektiös blieb, konnte nicht weiter verfolgt werden, da er aufgrund einer stark entzündeten Zehenverletzung während der Untersuchungsperiode mit Antibiotika (Baytril, Wirkstoff: Enrofloxacin) behandelt werden musste. Nach der antibiotischen Behandlung konnten keine Borrelien mehr mittels PCR in den frisch gehäuteten Nymphen nachgewiesen werden. Obwohl Doxycyclin als Mittel der Wahl gegen Borrelieninfektionen beim Igel eingesetzt wird (Finkbeiner-Weber 1996; S. Goroncy, persönliche Mitteilung) scheint auch Baytril eine gewisse Wirkung zu erzielen.

Ohne eine antibiotische Behandlung ist davon auszugehen, dass Borrelien in Igel über Wochen bis Monate in Igel persistieren können. Finkbeiner-Weber (1996) konnte bei einem Igel, der ein Erythema migrans aufwies, noch nach 19 Wochen Borrelien aus einer Hautbiopsie in unmittelbarer Nähe der Zeckeneinstichstelle isolieren.

Ein weiterer Igel, der erstmalig in den „Igelgarten“ gesetzt wurde, starb kurze Zeit nach der Exposition, vermutlich durch den massiven Zeckenbefall in Verbindung mit einem erheblichen Blutverlust und erfolgter Pathogenübertragung. In den schwärzlich verfärbten Lymphknoten des Mesenterialgewebes konnte *B. bavariensis* DNA nachgewiesen werden.

Obwohl die Infektion noch nicht in den inneren Organen nachweisbar war, zeigt dieses Ergebnis, dass *B. bavariensis* hoch invasiv ist und sich schon innerhalb weniger Tage über das Lymphsystem im Körper des Igels ausbreitet. Von dieser Art könnte daher eine erhöhte Pathogenität für Igel, ähnlich wie für Menschen, ausgehen.

Es ist durchaus möglich, dass Igel nach einer starken Zeckeninfestation eine Infektion mit Krankheitssymptomen entwickeln können, die auch zum Tod führen kann. Finkbeiner-Weber (1996) dokumentierte akute Borreliose-Fälle mit klinischer Erscheinung bei Igel.

Vorwiegend konnte ein vorübergehend gestörtes Allgemeinbefinden mit Inappetenz, Apathie und Ataxie diagnostiziert werden. Neben Fieber trat auch das typische Erythema migrans auf. Zurückliegende Infektionsexperimente bei Igel mit Rückfallfieber-Borrelien zeigten, dass einige Arten in Igel besser persistieren als andere (Lapierre et al. 1959). Igel (*E. europaeus*) zeigten sich gegen eine Infektion mit *Borrelia duttonii* resistent, entwickelten bei Infektion mit *B. crocidurae* eine inapparente Erkrankung, bei *B. hispanica* eine deutliche Erkrankung und bei *B. persica* eine schwerwiegende Symptomatik (Lapierre et al. 1959). Felsenfeld (1965) schlussfolgerte aus diesen Ergebnissen, dass die Reaktion von Igel auf Borrelieninfektionen in Abhängigkeit des verabreichten *Borrelia*-Stammes und der Dosis stark variieren kann und experimentelle Studien mit Labortieren im Allgemeinen vereinheitlicht werden sollten.

Welche Arten des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes in welcher verabreichten Dosis bei Igel zu klinischen Symptomen führen, muss durch weitere gezielte Experimente untersucht werden, was sich aber durch den heutigen Schutzstatus schwierig gestaltet.

Im Gegensatz zu den beiden erstmalig in den „Igelgarten“ eingesetzten Tieren verlief die xenodiagnostische Untersuchung bei den 4 Igel, die über mehrere Jahre einer starken Zeckenexposition im „Igelgarten“ ausgesetzt waren, nahezu negativ. Lediglich ein Igel infizierte 1 von 20 Larven mit *B. spielmanii*; die anderen Igel übertrugen keine Borrelien auf die angesetzten Larven. Aus diesem Grund stuften wahrscheinlich auch die Autoren Matuschka et al. (1996) die Reservoirkompetenz von Igel für *B. burgdorferi* s.l. als gering ein, da in der Studie von Gray et al. (1994) lediglich 1 von 5 Larven von einem Igel infiziert wurde.

Einige Untersuchungen belegen, dass *Borrelia*-Genospezies unterschiedlich effektiv von Wirtstieren auf Zecken übertragen werden (Hu et al. 2001, Schlee 2005). Bilche übertragen *B. spielmanii* effektiver auf Zecken als *B. afzelii* (Richter et al. 2004 a). Selbst innerhalb einer Genospezies kann dieses Phänomen auftreten, weshalb interspezifische, aber auch intraspezifische Interaktionen in Betracht gezogen werden (Derdáková et al. 2004). Eine solche Interaktion wurde sogar bei Bakterien unterschiedlicher Klassen (Borrelien und Anaplasmen) demonstriert (Levin & Fish 2001). Ähnliche Transmissionsergebnisse erbrachten Kurtenbach et al. (1998): *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* konnten beide in Nagetieren detektiert werden, allerdings wurde nur *B. burgdorferi* s.s. auf xenodiagnostische Zecken übertragen.

Welche Mechanismen einer erfolgreichen Erregertransmission zugrunde liegen, ist bisher weitgehend unklar. Derdáková et al. (2004) stellen die Hypothese auf, dass *Borrelia*-Varianten einen unterschiedlichen Wirtsgewebetropismus aufweisen und sich unterschiedlich stark im Gewebe vermehren, was sich auf den Transmissionserfolg auf Zecken auswirkt.

Tsao et al. (2009) versuchen in ihrem Review die einzelnen Forschungsergebnisse zur Übertragung von Borrelien im Mausmodell zu einem hypothetischen Modell zusammenzufügen (Abbildung 35). Wie die Erläuterungen in der Abbildung verdeutlichen, basieren einige Ereignisse bislang nur auf Vermutungen oder sind ungeklärt. Es besteht erheblicher Forschungsbedarf, wie sich die einzelnen Genospezies in verschiedenen Wirtstieren und Vektoren in Abhängigkeit von der Immunabwehr verhalten.

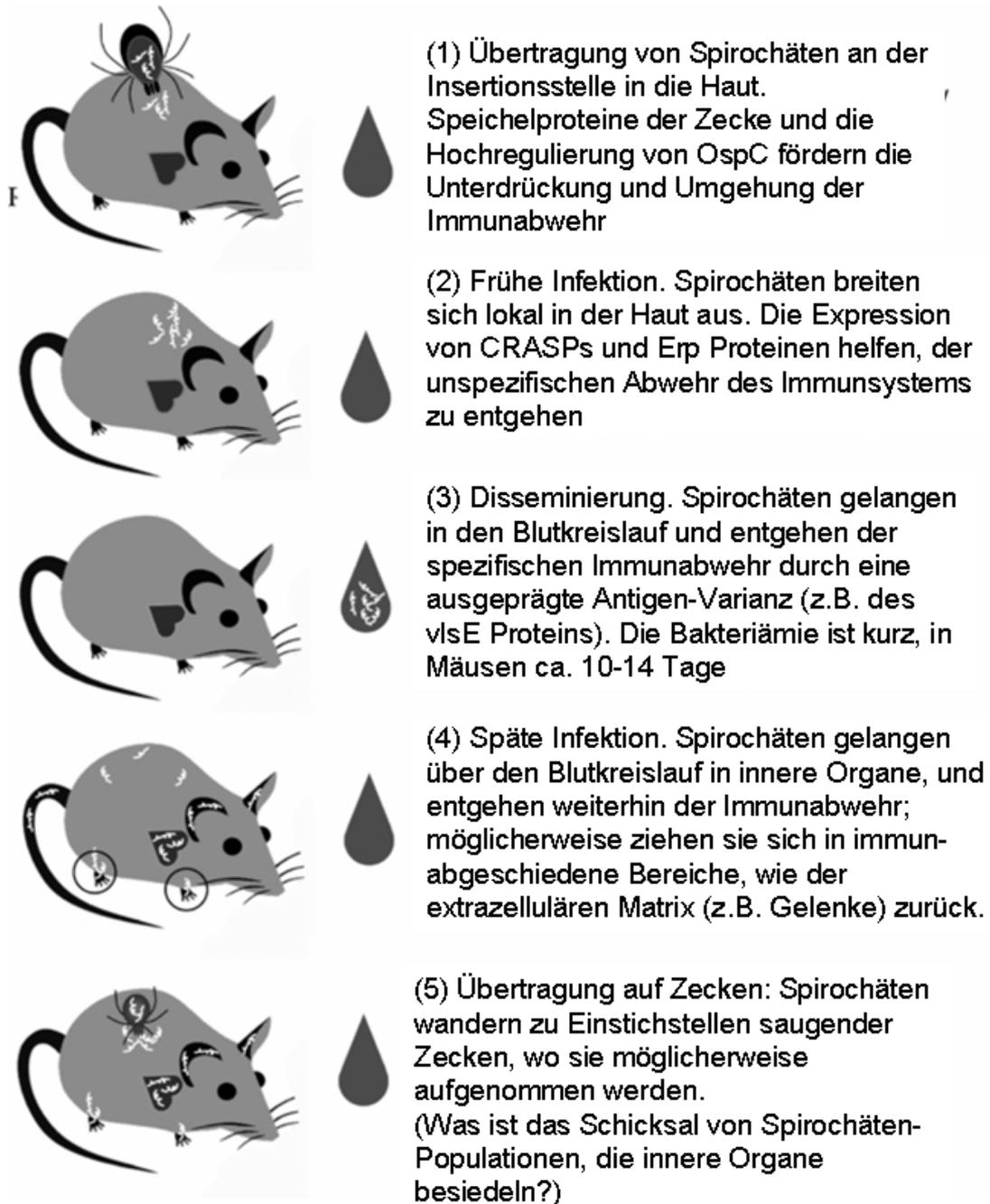


Abbildung 35: Mausmodell zur Übertragung von Borrelien, nach Tsao et al. (2009) modifiziert.

#### 5.1.4 Mögliche Immunität bei Igel?

Die Ergebnisse der serologischen Untersuchung und die niedrige Infektiosität von mehrjährigen Igel aus dem „Igelgarten“ werfen die Frage auf, ob Igel nach einer gewissen Expositionszeit und wiederholtem Erregerkontakt eine Immunität gegen einzelne *Borrelia*-Genospezies aufbauen können. Neben der unspezifischen Abwehr durch den

alternativen Weg des Komplementsystems spielt auch die erworbene Immunität des Wirtstieres eine entscheidende Rolle im Kreislauf von *Borrelia burgdorferi* s.l. (Kurtenbach et al. 2006).

In einigen Laborstudien an Nagetieren gelang der Nachweis, dass die adaptive Immunität eines Wirtes einen entscheidenden Einfluss auf die Transmissionsrate von Borrelien ausübt (Fikrig et al. 1992, Gern et al. 1994, Tsao et al. 2001). Des Weiteren hatte eine Immunisierung den Effekt, dass Tiere gegen eine erneute Infektion mit demselben Borrelienstamm, zumindest für einen gewissen Zeitraum, geschützt waren (Fikrig et al. 1990, Schmitz et al. 1990, 1991, Gern et al. 1994, Probert et al. 1997). Sowohl die Injektion von Serum immunisierter Tiere als auch die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine des Erregers bewahrte empfängliche Artgenossen vor einer Infektion (Johnson et al. 1986 a, b, Schaible et al. 1990). Kochi et al. (1993) zeigten, dass *B. burgdorferi* gegenüber der unspezifischen bakteriziden Aktivität von menschlichem Serum resistent war, aber bei Zugabe spezifischer Antikörper vom IgG-Typ schnell zerstört wurde.

Die Verabreichung von Antisera führte auch in der Untersuchung von Liang et al. (2004) im Wirtsgewebe zu einem starken Rückgang von Spirochäten. Während in der Haut die zelluläre Abwehr für die Eliminierung von Borrelien entscheidend ist, führt die humorale Abwehr in Organen zum Rückgang von Borrelien (Liang et al. 2004). Diese Experimente zeigen, dass sowohl Mechanismen der unspezifischen als auch spezifischen Abwehr wichtig für die Verhinderung einer erneuten Infektion sind.

Die Immunität bei Igel gegen einzelne *Borrelia*-Genospezies könnte unterschiedlich ausgeprägt sein. Reinfektionen beim Menschen werden gewöhnlich durch einen anderen Borrelien-Stamm ausgelöst, obwohl auch Reinfektionen mit dem gleichen Stamm nach einer gewissen Latenzperiode möglich sind (Aberer 2007). Während Schlee (2005) bei Gartenschläfern nur eine Teilimmunität gegen *B. spielmanii* und *B. burgdorferi* s.s. nach Reinfektionen nachweisen konnte, scheinen Gartenschläfer gegen *B. afzelii* gänzlich immun zu werden, und infizierten infolge dessen keine an ihnen saugenden Zecken mehr. Dennoch ging auch bei Laborinfektionen von Gartenschläfern mit *B. spielmanii* die Infektiosität nach 9 Monaten stark zurück (Schlee 2005).

Basierend auf den hohen Reaktivitäten gegen eine Vielzahl an *Borrelia*-Antigenen und den hohen p18-Prävalenzen sowie der nahezu negativ verlaufenden Xenodiagnose bei mehrjährigen Tieren aus dem „Igelgarten“ scheint es naheliegend, dass auch Igel zumindest gegen *B. afzelii* und *B. bavariensis* nach einer gewissen Zeit eine Immunität aufbauen. Vermutlich kommt es nach der Infektion mit *B. spielmanii* zu keiner 100 %igen

Immunisierung, da ein adulter Igel aus dem „Igelgarten“ trotz jahrelanger natürlicher Borrelienexposition eine Zeckenlarve mit *B. spielmanii* infizierte.

Im Immunblot der untersuchten Seren zeigten sich starke Reaktivitäten gegen die einzelnen Antigene. Der hohe VlsE-Antikörperspiegel bei den untersuchten Igeln lässt auf ein ständiges „Wettrüsten“ zwischen Parasit und Wirt schließen. Möglicherweise werden Borrelien vereinzelt noch auf Zecken übertragen, dennoch dürfte sich die Infektiosität von Igeln im Laufe ihres Lebens erheblich verringern.

Ähnliche Ergebnisse zur Übertragung von Borrelien wurden auch von Kurtenbach et al. (1994) erzielt. Während Mäuse der Gattung *Apodemus* hohe Antikörpertiterkonzentrationen nach einer Borrelien-Infektion ausbildeten und nach erfolgter Immunisierung keine oder nur wenige Zecken infizierten, reagierten Mäuse der Gattung *Myodes* nur mit einer geringen Antikörperproduktion und einer hohen Transmissionsrate von Borrelien auf xenodiagnostische Larven. Auch im Freiland steuerten Individuen von *M. glareolus* mehr als dreimal so viele mit *Borrelia*-infizierte Zecken bei als *Apodemus sylvaticus*, was für eine höhere Reservoirkompetenz von *M. glareolus* spricht (Kurtenbach et al. 1994). Diesen Trend konnten auch andere Autoren bestätigen (Frandsen et al. 1995, Humair et al. 1999, Pawelczyk et al. 2000, Michalik et al. 2003, 2005, Kybicová et al. 2008). Bei Igel sprechen die sehr hohen Antikörpertiter ebenfalls für eine erniedrigte Reservoirkompetenz.

Interessanterweise wird bei Rötelmäusen (*M. glareolus*) bei wiederholtem Kontakt eine Immunität gegen Zecken ausgebildet, was bei *Apodemus flavicollis* nicht der Fall ist (Dizij & Kurtenbach 1995). Dies deutet darauf hin, dass eine erworbene Immunität gegen Zecken ebenfalls einen dichte-abhängigen Faktor zur Regulierung einer natürlichen Zeckenlast darstellt und zusätzlich Einfluss auf die Transmissionsrate von *B. burgdorferi* s.l. ausübt (Dizij & Kurtenbach 1995). Ob es bei Igeln ebenfalls zu einer Immunität gegen Zecken kommt, wurde bisher nicht untersucht.

In welchem Umfang eine Tierart also zur Anzahl Borrelien-infizierter Zecken in einem bestimmten Habitat beiträgt, hängt von vielfältigen Faktoren, wie der Zusammensetzung der Population (Anzahl empfänglicher oder immunisierter Individuen), der Infestationsrate mit Zecken, der Immunität gegen Zecken und gegen Borrelien, der Qualität und Quantität der Immunantwort, sowie den klimatischen und ökologischen Bedingungen.

## 5.2 *Anaplasma phagocytophilum*

*Anaplasma phagocytophilum* gehört zu den zeckenübertragenen Erregern, die im Vergleich zu *B. burgdorferi* s.l. bisher wenig erforscht sind. Die Epidemiologie zeigt ein sehr komplexes Muster mit verschiedenen *A. phagocytophilum*-Varianten, die in unterschiedlichen Wirbeltier- und Zeckenarten zirkulieren (Ismail et al. 2010).

### 5.2.1 Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme

Aus Kostengründen wurden nur Organpools von Igel auf Anaplasmen untersucht. Die Verwendung der gepoolten Organprobe bewies auch bei der *Anaplasma*-Untersuchung ihre Effizienz. Sowohl die 16S rDNA-PCR auf dem Thermocycler, als auch die 16S rDNA-PCR auf dem LightCycler eigneten sich zum Nachweis von *Anaplasma phagocytophilum* in Igel. Obwohl die zweitgenannte Methode auch *Ehrlichia*-Arten detektiert, konnte lediglich *A. phagocytophilum* in Igel gefunden werden, was auch durch die anschließende Sequenzierung bestätigt wurde. Es kam zu ausgeprägten Signalen positiver Proben in beiden verwendeten PCR-Systemen. Im Vergleich dazu verläuft der direkte Erregernachweis mittels PCR in Haus- und Nutztieren oft nicht erfolgreich (Aguirre et al. 2004, Solano-Gallego et al. 2006, Billeter et al. 2007).

### 5.2.2 Epidemiologische Daten

#### 5.2.2.1 *Anaplasma phagocytophilum* im Wirtstier Igel

Erstmalig wurde in der vorliegenden Untersuchung *Anaplasma phagocytophilum* in Organpools von Igel nachgewiesen. In 24 von 271 Igel (8,9 %) der Gattung *Erinaceus* konnte *A. phagocytophilum*-DNA gefunden werden. 23 von 251 Tieren (9,2 %) der Art *Erinaceus europaeus* waren infiziert, aber auch bei einem von 10 Igel (10,0 %) der Art *Erinaceus concolor* aus der Türkei konnte der Erreger nachgewiesen werden, was für eine Reservoirwirtfunktion auch von verschiedenen Igelarten spricht. Die untersuchten *E. roumanicus* waren nicht infiziert. Auch in Großbritannien konnten keine Infektionen in Igel nachgewiesen werden, obwohl *A. phagocytophilum* dort nachweislich in Zecken und Kleinsäugetern zirkuliert (Bown et al. 2003, 2011).

In natürlichen *A. phagocytophilum*-Infektionszyklen wird einerseits Nagetieren und andererseits Wiederkäuern eine Schlüsselrolle als Reservoirwirt zugeschrieben (Bown et al. 2003, Ladbury et al. 2008). Oft ist eine beachtliche Anzahl der Individuen einer Wirtstierpopulation subklinisch infiziert, ohne offensichtlich zu erkranken (Telford et al. 1996, Alberdi et al. 2000, Ladbury et al. 2008).

Untersuchungen zur Reservoirwirtfunktion bei Nagetieren deuten darauf hin, dass Wühlmäuse (Cricetidae, früher Arvicolidae) eine bedeutendere Funktion als Reservoirwirt für *A. phagocytophilum* einnehmen als Echte Mäuse (Muridae). In einer Studie von Bown et al. (2003) waren 23 von 201 (11 %) untersuchten *Myodes glareolus* (Cricetidae) positiv, während nur 7 von 390 (1,8 %) untersuchten Muridae (*Apodemus sylvaticus*) eine Bakteriämie zeigten. Zu ähnlichen Untersuchungsergebnissen kamen auch Hartelt et al. (2008), die in Wühlmäusen Prävalenzen von 13,4 % (*Myodes glareolus*) bzw. 6,2 % (*Microtus agrestis*) ermittelten, aber nur in einem von 259 Tieren (0,4 %) der Gattung *Apodemus* spp. (Familie Muridae) eine Infektion mithilfe von PCR nachgewiesen. Ähnliche Infektionsraten von 8,8 % fanden auch Cao et al. (2006) in Nagetieren in der Provinz Jilin in China.

Bown et al. (2003) führen die unterschiedlichen Infektionsraten der verschiedenen Tierarten auf die Anzahl der Zeckenstadien auf den Tieren, die Lebensweise und das Habitat zurück. Die Autoren gehen davon aus, dass Vertreter der Wühlmäuse, z.B. Rötelmäuse (*M. glareolus*), ungefähr viermal mehr Nymphen tragen als Waldmäuse (*Apodemus* spp.).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lagen die *A. phagocytophilum*-Prävalenzen in Igel über ganz Deutschland verteilt zwischen 2,7 % (Hamburg) und 16,7 % (München). Auch in Tschechien lag die Prävalenz bei über 10 %. In anderen Insektivoren, wie der Spitzmaus (*Sorex araneus*), konnte in 121 von 647 (18,7 %) Blutproben *A. phagocytophilum* detektiert werden (Bown et al. 2011).

Betrachtet man die epidemiologische Situation, nimmt der Igel höchstwahrscheinlich eine Reservoirwirtfunktion vergleichbar mit der von Wühlmäusen ein. Offenbar geht von Igel und anderen Insektivoren sogar ein noch größeres Reservoirpotential aus, da auf ihnen erheblich mehr Zeckenstadien parasitieren (Bown et al. 2011).

*A. phagocytophilum*-Infektionen bei Igel wurden von März bis November detektiert. In einer Berliner Studie wurden bei Hunden 17 von 18 klinische Fälle innerhalb der Monate April und September diagnostiziert und nur ein Fall im November (Kohn et al. 2008). Der direkte Erregernachweis von *A. phagocytophilum* im Blut steht daher vor allem mit der Saisonalität von Zecken in Verbindung (Carrade et al. 2009). Die bimodale Aktivität macht sich auch in

der *Anaplasma*-Prävalenz von Igel n bemerkbar: insbesondere im Frühjahr und Herbst konnten viele infizierte Tiere gefunden werden. In den Wintermonaten dagegen nicht.

Hinsichtlich des Infektionsstatus in den 3 Gewichtgruppen bzw. Alterskategorien konnte kein Trend beobachtet werden: das Gewicht infizierter Tiere reichte von 142 g bis 1005 g.

### **Genetische Varianten und Assoziation mit Reservoirwirten**

Bei der Sequenzanalyse der durchschnittlich 800 bp langen 16S rDNA-Fragmente von Igel n und deren Zecken konnte nur eine 99 %ige Übereinstimmung mit den bisher auf GenBank hinterlegten *A. phagocytophilum*-Sequenzen erzielt werden (Tabelle 27). Die aus Igelorganen hauptsächlich isolierte *Anaplasma*-Variante wies an einer bestimmten Stelle der DNA-Sequenz ein Adenin (A) anstelle eines Guanins (G) auf.

Dieser Unterschied scheint igelspezifisch zu sein, und wurde bisher noch bei keiner anderen Tierart gefunden. Ob es sich bei den Untersuchungen von Nijhof et al. (2007) um die gleiche *A. phagocytophilum*-Variante in *Ixodes hexagonus* handelte, ist nicht nachvollziehbar, da keine DNA-Sequenzen zum Vergleich auf GenBank archiviert wurden.

23 Sequenzen, die in der vorliegenden Arbeit generiert wurden, sind auf GenBank hinterlegt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um die beschriebene igelspezifische *A. phagocytophilum*-Variante. Lediglich die Sequenz eines Igels aus Hessen (GenBank Acc. No. FN390881) unterscheidet sich in 2 Nukleotiden von der typischen Igelsequenz. Diese Sequenz ist auf GenBank bisher einzigartig.

Bei der Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte eines *Anaplasma*-positiven Igels aus Berlin wichen die Sequenzen der Klone ebenfalls voneinander ab, was für eine Mischinfektion mit verschiedenen Stämmen in dem untersuchten Igel spricht. Auch bei anderen Tierarten, wie beispielsweise Schafen, ist das simultane Auftreten von mehreren Varianten innerhalb einer Population, oder auch in Wirtsindividuen beschrieben (Stuen et al. 2002).

Die 16S rDNA-Sequenzen deuten darauf hin, dass der Igel als Wirt einer spezifischen *A. phagocytophilum*-Variante eine zentrale Rolle spielt, zusätzlich aber auch für weitere Stämme empfänglich ist. Auch bei anderen Tieren dominiert meist eine einzelne *A. phagocytophilum*-Variante im Blut (Stuen et al. 2005, Ladbury et al. 2008). Die isolierte Sequenz des Igels (*E. concolor*) aus der Türkei war zu 100 % identisch mit den westeuropäischen Igelisolaten (*E. europaeus*). Dieses Ergebnis zeigt, dass die igelspezifische

Variante vermutlich über den ganzen europäischen Kontinent verbreitet ist und auch verschiedene *Erinaceus*-Arten dafür empfänglich sind.

Tabelle 27: 99 %ige Sequenzübereinstimmung der igelspezifischen *Anaplasma phagocytophilum*-Variante im Sequenzvergleich mit anderen auf GenBank hinterlegten 16S rDNA-Isolaten aus Säugetieren (Stand August 2010). Bei den mit \* gekennzeichneten Tieren konnten klinische Symptome beobachtet werden.

Familie	Tierart	Trivialname	Probenmaterial	Herkunft	GenBank No
Cricetidae	<i>Myodes glareolus</i>	Waldwühlmaus	Blut	England	AY082656
		/Rötelmaus		Russland	AY094353
Cricetidae	<i>Peromyscus leucopus</i>	Weißfußmaus	Blut	USA	ESU72879
Cricetidae	<i>Tscherskia triton</i>	Rattenartiger Zwerghamster	Milz	China	GQ412339
Muridae	<i>Apodemus agrarius</i>	Brandmaus	Milz	China	DQ342324
				China	GQ412337
Muridae	<i>Apodemus peninsulae</i>	Koreanische Waldmaus	Milz	China	DQ449945
Muridae	<i>Niviventer coxingi</i>	Weißbauchratte	Milz	China	DQ458808
Muridae	<i>Rattus losea</i>	Reisfeldratte	Milz, Leber	China	HM439430
Muridae	<i>Rattus norvegicus</i>	Wanderratte	Milz	China	DQ458807
Sciuridae	<i>Tamias sibiricus</i>	Gestreiftes Backenhörnchen	Milz	China	DQ449946
Leporidae	<i>Sylvilagus</i>	Kaninchen		USA	AY144728
Leporidae	<i>Lepus sinensis</i>	Chinesischer Hase	Milz	China	DQ458806
Cervidae	<i>Rangifer tarandus</i>	Ren		USA	AF469005
Cervidae	<i>Hydropotes inermis argyropus</i>	Koreanisches Wasserreh	Milz	Südkorea	GU556625
Cervidae	<i>Capreolus capreolus</i>	Reh	Milz	Slowenien	AF481854
Cervidae	<i>Cervus elaphus</i>	Rothirsch	Milz	Slowenien	AF481855
Bovidae		Schaf*	Blut	China	GQ412338
Camelidae		Lama*	Blut	USA	AF241532
Canidae		Hund*		Schweden	ESU10873
Equidae		Pferd*		Schweden	AY527213AY
				USA	527214AF172
				Schweiz	167AF172164 AF057707
Hominidae		Mensch*	Blut	USA	AF093789AF0 93788M73220

Die verschiedenen *A. phagocytophilum*-Stämme scheinen bevorzugte Reservoirwirte zu haben und unterschiedlich pathogen für die jeweilige Wirtstierart zu sein (Franzén et al. 2005, Foley et al. 2008, Granquist et al. 2010). Stämme von Wühlmäusen wurden bisher ausschließlich in Assoziation mit Wildtieren gefunden; menschliche Infektionen mit diesen Stämmen wurden bisher noch nicht nachgewiesen (Zhan et al. 2010). Stämme von Hörnchen (Sciruidae) und Weißfußmäusen können diverse Labortiere infizieren und möglicherweise auch den Menschen (Nathan & Foley 2008). Ein weiteres Beispiel von Foley et al. (2009) aus Amerika zeigt, dass ein aus Streifenhörnchen isolierter Stamm sowohl Nagetiere als auch Pferde infizieren kann, wohingegen ein Stamm aus Ratten nur in Nagetieren einen Gewebetropismus aufweist und nicht für Pferde infektiös ist. Wiederkäuer können beispielsweise mit der Ap-1 Variante infiziert werden, Nagetiere hingegen nicht (Massung et al. 2007).

Ob die in Igel gefundenen *A. phagocytophilum*-Varianten ebenfalls Krankheitssymptome bei domestizierten Tieren und dem Menschen auslösen, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht genau beantwortet werden und muss durch weitere Charakterisierung geklärt werden. Möglicherweise sind die in Igel gefundenen Varianten für Hunde und Pferde pathogen, da sie auch in deren Blut detektiert wurden (Dr. C. Silaghi, persönliche Mitteilung).

Allein durch eine Analyse der 16S rDNA lässt sich nicht auf die Pathogenität des Erregers schließen: Zhan et al. (2010) isolierten aus einer Region im Nordosten von China identische 16S rDNA-Varianten aus Nagetieren und Schafen aus einem gemeinsamen Habitat, wobei die Schafe einen stark moribunden Eindruck machten.

In der vorliegenden Arbeit wurde nur die 16S rDNA untersucht. Dieses Gen wurde bei vielen *A. phagocytophilum*-Untersuchungen genutzt. Allerdings zeigte sich nur eine gering ausgeprägte Genotyp-Variabilität (Stuen et al. 2002, Von Loewenich et al. 2003, Ladbury et al. 2008). Weitere Genloci, wie z.B. das „major surface protein“-Gen 2 (*msp2*) bzw. *msp4*, oder das *ankA*-Gen zeigen eine weitaus größere intraspezifische Sequenzvariation und belegen die Vielfalt der Genotypen (Von Loewenich et al. 2003, De la Fuente 2005, Bown et al. 2007, Ladbury et al. 2008, Zhan et al. 2010). Ladbury et al. (2008) konnten 24 Genotypen von *A. phagocytophilum* in einer einzigen Schafsherde nachweisen. In der 16S rDNA-Analyse waren diese Genotypen hingegen nicht voneinander unterscheidbar. Im Gegensatz dazu fanden Stuen et al. (2002) auch unterschiedliche 16S rDNA-Varianten in einer Schafsherde. Von Loewenich et al. (2003) konnten in Deutschland 7 verschiedene 16S rDNA-Varianten von *A. phagocytophilum* allein in *Ixodes ricinus* nachweisen. Es sollten

daher bei den Igelisolaten noch weitere Genorte untersucht werden, um Unterschiede in den 16S rDNA-Varianten deutlich aufzuzeigen.

### **Persistenz in Säugetieren**

Levin & Fish (2000), die Weißfußmäuse (*Peromyscus leucopus*, Cricetidae) experimentell mit *A. phagocytophilum* infizierten, zeigten, dass der Erreger nur relativ kurz im Blut persistiert und nur während dieser Zeitspanne von Zecken aufgenommen werden kann. Die Ergebnisse von Bown et al. (2003) im Freiland deuten allerdings darauf hin, dass die Infektion bei *M. glareolus* über einen längeren Zeitraum anhält und individuell variiert. Wie lange *A. phagocytophilum* in Wirtsgewebe persistiert und zu einer chronischen Erkrankung führen kann, wird gegenwärtig in vielen Studien überprüft (Granquist et al. 2008, Carrade et al. 2009).

Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass *A. phagocytophilum* in der Lage ist, wichtige zelluläre und humorale Abwehrmechanismen im Säugetierwirt zu manipulieren und durch eine ausgeprägte Antigenvarianz wiederkehrende Infektionen auslöst (Ladbury et al. 2008). Auf diese Weise können die Erreger über Monate hinweg selbst in immunkompetenten Wirten, wie es z.B. bei Schafen gezeigt wurde, persistieren (Stuen et al. 1998, 2001, Granquist et al. 2008, 2010). Allerdings ist eine Bakteriämie nicht durchgehend konstant, sondern taucht wellenförmig, nachdem die meisten Erreger im Blut abgetötet wurden, wieder auf (Granquist et al. 2008, Ladbury et al. 2008).

### **Pathogenität**

Innerhalb einer Tierart können verschiedene 16S rDNA-Varianten auftreten, wobei sich die Pathogenität erheblich unterscheiden kann. Granquist et al. (2010) infizierten Schafe mit 2 verschiedenen 16S rDNA-Varianten. Der Verlauf der beiden Varianten verlief zyklisch. Trotz einer lang andauernden Bakteriämie von mehr als 6 Monaten variierte bei Schafen die Anzahl der Erreger im Blut, was auf Unterschiede auf individueller Ebene hindeutet, aber auch für eine variant-abhängige Ursache spricht. Insbesondere in der Pathogenität zeigten sich deutliche Unterschiede: Lämmer, die mit der 16S rDNA-Variante 1 (Ap 1; identisch mit GenBank Acc. No. M73220) infiziert worden waren, zeigten eine länger andauernde

Fieberperiode, eine signifikant längere Dauer der anfänglichen Bakteriämie und eine deutliche Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut (Neutropenie) als Lämmer mit der Variante 2 (Ap 2; identisch mit GenBank Acc. No. AF336220). Variante 1 ist auch für tödliche Verläufe bei Schafen bekannt (Stuen et al. 2003). Der Sequenzabgleich der Igel-Variante zeigt einen näheren Verwandtschaftsgrad zur Variante Ap 1 als zu Ap 2.

Granquist et al. (2010) gehen davon aus, dass die natürliche Verbreitung einiger 16S rDNA-Varianten aufgrund ihrer Wirtsassoziation und der Fähigkeit, lang anhaltende und wiederkehrende Bakteriämien auszulösen, forciert wird.

Wie *A. phagocytophilum*-Infektionen über einen längeren Zeitraum bei insgesamt 41 Igel aus dem „Igelgarten“ verliefen, wird momentan in Kooperation mit Dr. C. Silaghi (Ludwig-Maximilians-Universität, München) mithilfe von EDTA-Vollblut und vollgesogenen Zecken überprüft. Die Ergebnisse werden in Kürze publiziert (Silaghi et al. 2011, in press). Basierend auf den vorläufigen Ergebnissen ist davon auszugehen, dass Igel eine subklinisch verlaufende, zyklische Infektion entwickeln können. Auch bei anderen Tierarten kommt es zu einer regelmäßig wiederkehrenden Bakteriämie, wenn auch auf einem niedrigen Level (Barbet et al. 2001, Granquist 2010). Während Reinfektionen bei Hunden bisher nicht dokumentiert wurden, liegt ein Bericht über eine menschliche Reinfektion vor (Horowitz et al. 1998). Pferde zeigten sich nach einer erneuten Infektion immun (Barlough et al. 1995). Entscheidend für eine Reinfektion dürfte die jeweilige infizierende *A. phagocytophilum*-Variante und der Infektionsdruck durch Zecken sein.

Obwohl die biologischen Zusammenhänge der genetischen *A. phagocytophilum*-Varianten im natürlichen Kreislauf noch weitestgehend unverstanden sind und hauptsächlich auf einzelnen Beobachtungen und Vermutungen basieren (Massung et al. 2002, Bown et al. 2003, Ladbury et al. 2008), zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Igel eine wichtige Rolle im epidemiologischen Zyklus einnehmen. Eine weiterführende Charakterisierung der *A. phagocytophilum*-Isolate aus Igel ist daher unabdingbar und wird momentan mit verschiedenen Kooperationspartnern durchgeführt (Dr. C. Silaghi, Ludwig-Maximilians-Universität München und Dr. F. von Loewenich, Universitätsklinikum Freiburg).

### 5.2.2.2 *Anaplasma phagocytophilum* in gesaugten Zecken

In vielen Untersuchungen liegt die Prävalenz von *Anaplasma phagocytophilum* in wirtssuchenden Zecken in Europa unter 10 % (Hartelt et al. 2004, Reis et al. 2010, Reye et al. 2010, Derdáková et al. 2011). Die meisten Angaben beziehen sich dabei auf *Ixodes ricinus*. In Deutschland liegt die Prävalenz zwischen 1,6 und 4,5 % bei nüchternen *I. ricinus* (Baumgarten et al. 1999, Fingerle et al. 1999, Hildebrandt et al. 2003, Von Loewenich et al. 2003, Hartelt et al. 2004, Silaghi et al. 2008, Franke et al. 2011).

Allerdings variiert die Durchseuchung von *I. ricinus* saisonal und regional. In einigen europäischen Gebieten werden auch durchschnittliche Infektionsraten von über 10 % erreicht z.B. in Bulgarien (19,8 %), Polen (14,1 %) und Dänemark (23,6 %) (Christova et al. 2001, Grzeszczuk & Stańczak 2006, Skarphéðinsson et al. 2007).

In gesaugten Zecken von Wirtstieren scheint die Prävalenz meist höher zu liegen. Bei Schafen waren 52 % der abgesammelten adulten Zecken sowie 28 % der Nymphen positiv (Ogden et al. 2003). In der vorliegenden Studie konnte *A. phagocytophilum* nur in *I. ricinus* Nymphen von einem Igel nachgewiesen werden. Dieses Tier war ausschließlich mit dieser Zeckenart befallen. Die Gesamt-Prävalenz in *I. ricinus* Nymphenpools lag bei 30,6 %, ausgehend von einer Mindestinfektionsrate von 6,6 %.

In den Niederlanden konnte *A. phagocytophilum* in 15 von 237 untersuchten *Ixodes hexagonus* (6,3 %), die in Tierarztpraxen von verschiedenen Tieren abgesammelt wurden, detektiert werden (Nijhof et al. 2007). Ausschließlich die von Igeln stammenden Zecken waren *A. phagocytophilum*-positiv. Die 137 untersuchten Zecken von Igeln stammten wiederum von nur 3 der insgesamt 18 Igel. Dieses Ergebnis bestätigt die Theorie, dass einzelne Individuen ganz entscheidend zur Verbreitung von infizierten Zecken beitragen.

*A. phagocytophilum* wird primär transstadial weitergegeben (Bown et al. 2003). Zusätzlich könnte der Mechanismus des Co-feedings eine Rolle spielen (Bown et al. 2003). Allerdings fanden Baldrige et al. (2009) auch eine transovarielle Übertragung von *A. phagocytophilum*-Varianten in *Dermacentor*-Zecken und schlussfolgerten daraus, dass *A. phagocytophilum* in der Natur nicht nur horizontal weitergegeben wird.

Nicht nur in *I. ricinus*, sondern auch in anderen Schildzecken, wie *I. hexagonus* (Nijhof et al. 2007), *Dermacentor reticulatus* (Matsumoto et al. 2009) und *D. marginatus* (De la Fuente et al. 2005, Merino et al. 2005) wurde *A. phagocytophilum* nachgewiesen. In Spanien fanden

Barandika et al. (2008) den Erreger in *Haemaphysalis punctata*, *H. concinna* und *Rhipicephalus bursa*.

In Gebieten, in denen *I. ricinus* nicht vorkommt, können wirtsspezifische Zeckenarten eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von enzootischen Basis-Zyklen spielen (Bown et al. 2003). In den USA ist ein wirtsspezifischer Zyklus von Kaninchen und *Ixodes denatus* beschrieben (Goethert & Telford 2003). In einer Studie im Nordwesten von England wird *A. phagocytophilum* in einem *Ixodes trianguliceps*-Nagetier-Zyklus aufrechterhalten (Bown et al. 2003). *I. trianguliceps* ist eine wirtsspezifische, nestassoziierte Zecke, die primär auf kleinen Nagetieren und Insektivoren parasitiert (Petney et al. 2011). Man findet sie hauptsächlich auf Rötelmäusen (*Myodes glareolus*) und Gelbhalsmäusen (*Apodemus flavicollis*). Obwohl es in dem Untersuchungsgebiet von Bown et al. (2003) keine *I. ricinus* Exemplare gab, waren bis zu 11 % der Nagetiere *A. phagocytophilum*-positiv.

Dass in Großbritannien keine infizierten *I. hexagonus*-Zecken gefunden wurden, liegt möglicherweise an einer lokalen Verbreitung bzw. an dem fehlenden Infektionsdruck durch *I. ricinus*.

### **5.3 *Rickettsia* spp.**

#### **5.3.1 Sensitivität und Spezifität der PCR-Nachweissysteme**

In der vorliegenden Arbeit konnte in keinem der untersuchten Organpools, Rickettsien mittels glta-PCR nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gelang es Perseke (2010) vereinzelt, mittels dieser PCR *Rickettsia*-DNA in Organpools von Igel zu detektieren. Bei 2 von 5 Tieren erwiesen sich Organpools in der glta-PCR als positiv; allerdings war dieser Befund nicht in anderen PCR-Systemen (z.B. ompB-PCR) reproduzierbar und auch die Sequenzierung erbrachte keine Zuordnung bis hin zur Art (Perseke 2010).

Erst kürzlich zeigte die Untersuchung von Schex et al. (2011), dass Ohrbiopsien von Nagern für die Detektion von Rickettsien geeigneter sind als deren Organe. In dieser Studie wurden vergleichend Leberproben und Ohrbiopsien getestet, wobei in 7 von 39 Ohrbiopsien Rickettsien detektierbar waren, jedoch in keiner der zugehörigen Leberproben. Es wird angenommen, dass die Infektion bei Kleinsäugetieren vor allem lokal auf die Haut beschränkt bleibt. Da bei den Igel Organpools ohne Hautgewebe getestet wurden, ist es durchaus möglich, dass trotz einer akuten Infektion in der Haut keine Rickettsien gefunden wurden.

Diese Vermutung wird auch durch die Tatsache gestützt, dass die untersuchten Zecken des Igels Nr. P4 aus dem Bienwald hochgradig mit *Rickettsia* spp. infiziert waren, aber diese Infektion nicht in seinem Organpool nachweisbar war. Erst durch die anschließende Untersuchung einer Hautbiopsie konnte die Infektion bestätigt werden, es gelang allerdings keine Artdifferenzierung. Daher sollte in zukünftigen Studien zur *Rickettsia*-Untersuchung bei Igeln nicht nur Organpools, sondern auch eine Hautbiopsie in die Untersuchung mit eingeschlossen werden.

### 5.3.2 Epidemiologische Daten

#### 5.3.2.1 *Rickettsia* spp. im Wirtstier Igel

Viele verschiedene Wirte werden als Reservoir für Rickettsien diskutiert. Meist gelingt der Nachweis aus Zecken, aber nicht aus Blut oder Wirtsgewebe (Barrs et al. 2010).

Dieses Phänomen konnte auch bei der Untersuchung von Organproben in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden: in keinem der 271 untersuchten Igelorganpools konnten Rickettsien mittels PCR detektiert werden.

Es ist anzunehmen, dass Igel auf jeden Fall bei der Verbreitung von *Rickettsia helvetica* beteiligt sind, da die stichprobenartig sequenzierten Isolate aus Zecken von Igeln ausschließlich dieser *Rickettsia*-Art zugeordnet werden konnten (Perseke 2010).

Eidechsen (*Lacerta agilis*) werden als mögliche Reservoirwirte für *R. helvetica* in Westeuropa in Betracht gezogen (Tijssse-Klasen et al. 2011). Obwohl bei den Untersuchungen von Tijssse-Klasen et al. (2011) eine maximale Prävalenz in nüchternen Zecken von 12 % und in gesaugten Zecken von bis zu 36 % mithilfe der Maximum-Likelihood-Methode angenommen wurde, konnte in keiner der 1156 Blutproben von Eidechsen *R. helvetica* detektiert werden. Auch bei Hunden und Katzen konnte *R. helvetica* häufig in Zecken, aber nicht in Blutproben nachgewiesen werden (Boretti et al. 2009).

Vereinzelt ist auch der Nachweis von *R. helvetica* aus Blut erfolgreich. In Japan gelang erstmalig der Nachweis aus dem Blut von Sikahirschen (*Cervus nippon yesoensis*) (Inokuma et al. 2008). Sprong et al. (2009) wiesen *R. helvetica* in Vollblut von Mäusen, Rehwild und Wildschweinen nach. Diese Autoren gehen davon aus, dass *Ixodes ricinus* das eigentliche Reservoir für *R. helvetica* darstellt, und Vertebraten, insbesondere Zugvögel lediglich eine wichtige Rolle bei der geografischen Weiterverbreitung spielen (Sprong et al. 2009, Elfving et al. 2010).

### 5.3.2.2 *Rickettsia* spp. in gesaugten Zecken

Die Hypothese, dass Rickettsien-Infektionen beim Igel wie bei Nagern in der Haut lokalisiert sind, wird durch die Untersuchung der am Igel saugenden Zecken gestützt: in einer Vielzahl von gesaugten Zecken, sowohl in *Ixodes ricinus* als auch *I. hexagonus* konnten Rickettsien gefunden werden. Die Mindestinfektionsrate von *I. hexagonus* betrug dabei 2,0 % (Larven), 3,5 % (Nymphen) und reichte sogar bis 40,5 % bei adulten Weibchen. Bei *I. ricinus* Pools lag die Prävalenz sogar noch höher: die Mindestinfektionsrate lag bei Larven bei 8,0 %, bei Nymphen bei 17,6 % und die Prävalenz bei adulten Zecken bei ca. 40 %.

Erneut zeigte sich, dass die Mehrzahl infizierter Zecken von wenigen Tieren stammte. Wiederum lieferte das Tier, das auch zu den meisten mit *Borrelia*- und *Anaplasma*-infizierten Zecken beitrug, die meisten positiven *Rickettsia*-Zecken. Bei diesem Igel erfolgte zusätzlich auch eine Untersuchung der einzelnen Organe und einer Hautbiopsie, die sich in der gIta-PCR als stark positiv erwies. Die hohe Infektionsrate von 97 % der untersuchten Zecken sowie die positive Hautbiopsie sprechen für eine akute Rickettsiämie des Igels, auch wenn diese nicht in den Organen detektiert werden konnte und auch die Sequenzierung der Hautprobe keine Zuordnung bis zur Art erbrachte.

Nicht nur *Rickettsia helvetica*, sondern auch andere *Rickettsia*-Arten können in *I. ricinus* gefunden werden (Simser et al. 2002, Sprong et al. 2009, Milhano et al. 2010). In den Niederlanden wurde erstaunlicherweise auch DNA von Rickettsien der Fleckfieber-Gruppe, u.a. *Rickettsia typhi* und *R. prowazekii* in *I. ricinus* nachgewiesen (Sprong et al. 2009).

Sprong et al. (2009) gehen davon aus, dass bei Rickettsien die Vektoren selbst die wichtigsten Reservoirs darstellen. Bei einer Langzeitstudie über 9 Jahre betrug die Infektionsrate von *I. ricinus* Zecken in einem bestimmten Habitat bis zu 66 % und war bei allen Entwicklungsstadien annähernd gleich (Sprong et al. 2009). Die Autoren gehen davon aus, dass bei *R. helvetica* eine vertikale Transmission mit hoher Effizienz zur nächsten Zeckengeneration auftritt.

Neben *I. ricinus* besitzen auch andere Schildzecken Reservoirkompetenz für *R. helvetica* (Milhano et al. 2010). Alle Entwicklungsstadien von *I. hexagonus* waren in der vorliegenden Arbeit mit Rickettsien infiziert. Ob die Larven ihre Infektion transovariell oder durch den Saugakt am Igel erworben haben, bleibt offen. Dennoch beweist dieses Ergebnis, dass *R. helvetica* auch durch epidemiologische Zyklen mit ausgeprägter Wirts- und Zeckenassoziation verbreitet wird. Nijhof et al. (2007) konnten *R. helvetica* ebenfalls in 2

*I. hexagonus* Exemplaren nachweisen, die jeweils von einem Igel bzw. einer Katze abgesammelt wurden. *Haemaphysalis inermis* wurde vor Kurzem als wichtigster Vektor für *R. hevetica* in Ungarn identifiziert (Hornok et al. 2010).

Rickettsien konnten im Gegensatz zu den anderen getesteten Erregern, wie *A. phagocytophilum* oder *Borrelia* spp., in der vorliegenden Arbeit auch häufig in Zecken von Igeln der Britischen Inseln gefunden werden. Obwohl bisher angenommen wurde, dass in Großbritannien aufgrund der isolierten Lage weniger Pathogene zirkulieren als auf dem Festland, scheinen Rickettsien dort flächendeckend verbreitet zu sein. Erst kürzlich konnten dort *Rickettsia helvetica* aus *Ixodes ricinus* und *Rickettsia raoultii* aus *Dermacentor reticulatus* isoliert werden (Tijssse-Klasen et al. 2011). Die Tatsache das 48,6 % der untersuchten *Ixodes hexagonus* Weibchen in Großbritannien mit Rickettsien infiziert waren, deutet auf eine wichtige Rolle des Igels und seiner Zecken in der Epidemiologie des Erregers hin.

Nicht nur Zecken, sondern auch Flöhe tragen zur Aufrechterhaltung von epidemiologischen *Rickettsia*-Zyklen bei. *Rickettsia felis* wird weltweit in verschiedenen Floharten gefunden. Die Infektion der Flöhe erfolgt in erster Linie transovariell und kann sehr hohe Infektionsraten erreichen (Wedincamp & Foil 2002). Zu 100 % waren Igelflöhe (*Archaeopsylla erinacei*), die von Katzen abgesammelt wurden, mit *R. felis* infiziert (Gilles et al. 2008). In einer weiteren Studie konzentrierten sich diese Autoren auf die Untersuchung von *A. erinacei*, die von Igeln abgesammelt wurden (Gilles et al. 2009). Dabei zeigte sich, dass wiederum fast 100 % der Flöhe positiv in der ompB-PCR getestet wurden. Die Sequenzierung erbrachte aber nur eine 96 %ige Übereinstimmung mit *R. felis*, weshalb davon auszugehen ist, dass der Igel bzw. dessen Flöhe ein mögliches Reservoir für eine eigene *Rickettsia*-Variante darstellt. Über eine mögliche Pathogenität für den Menschen oder für andere Tierspezies kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

*R. felis* ist insbesondere auf Flöhe spezialisiert (Reif & Macaluso 2009) und konnte daher auch nicht in den vollgesogenen Zecken gefunden werden. Sprong et al. (2009) beschreiben allerdings auch Mischinfektionen von floh-, milben- und zecken-spezifischen Rickettsien in *I. ricinus*. Diese Autoren gehen davon aus, dass Kreuz-Infektionen unter natürlichen Bedingungen auftreten können, sobald *R. typhi/prowazekii* und *R. helvetica* sowie ihre Vektoren einen gemeinsamen Reservoirwirt nutzen. Weshalb daher *R. felis* nicht in den gesogenen Igelzecken bzw. *R. helvetica* in Igelflöhen (vgl. Gilles et al. 2009) auftraten, beruht möglicherweise auf derzeit noch unbekanntem selektiven Mechanismen.

## 5.4 FSME-Viren

### 5.4.1 Sensitivität und Spezifität des PCR-Nachweissystems

Die gewählte Reverse Transkription und die sich anschließende nested PCR nach Schrader & Süss (1999) gilt als aufwendige, aber sehr sensitive und spezifische Methode für die Detektion von FSME-Viren. Nur bei einem Tier wurden FSME-Viren im Organpool und in der anschließenden Untersuchung der Niere nachgewiesen. Bei dem Sequenzvergleich der positiven Probe mit anderen FSME-Virus Isolaten konnte eine 100 %ige Übereinstimmung des 131 bp Stückes mit „TBEV Hyp polyprotein gene“ erzielt werden und zu 99 % stimmte das Isolat mit dem mitteleuropäischen Virusprototyp „Neudoerfl“ überein. Eine eindeutige Stammzuordnung ist allerdings mit diesem kurzen DNA-Fragment nicht möglich.

Trotz wiederholtem Versuch, das Isolat des positiven Igels erneut in verschiedenen PCR-Systemen zu testen, ließ sich der molekularbiologische Nachweis aus dieser Probe nicht mehr reproduzieren. Eventuell lag die RNA in sehr niedriger Konzentration vor oder wurde durch das mehrmalige Auftauen zerstört. 9 vollgesogene Zecken (1 Weibchen, 7 Nymphen, 1 Larve von *I. ricinus*), die von diesem Igel stammten, wurden in der PCR negativ getestet. Da die Zecken bis zur Untersuchung mehrere Monate in 70 % Alkohol gelagert wurden, ist ein Abbau der RNA ebenfalls denkbar. Der molekularbiologische Nachweis in der Niere zeigt, dass Igel empfänglich für FSME-Viren sind. Ob es sich um intakte Viren oder lediglich um Virusreste handelt, kann auf diese Weise nicht geklärt werden. Hierfür wäre eine Anzucht in Hühnerembryonen erforderlich, die sehr kompliziert ist und nur in Speziallaboren durchgeführt wird.

### 5.4.2 Epidemiologische Daten

#### 5.4.2.1 FSME-Viren im Wirtstier Igel

Nur bei einem der 271 untersuchten Organpools ließen sich FSME-Viren molekularbiologisch nachweisen und durch eine anschließende Sequenzierung bestätigen. Bei dem infizierten Tier handelte es sich um einen ausgewachsenen Igel, der Ende Mai 2006 in einem Garten in Potsdam gefunden wurde und aufgrund einer Gesichtsverletzung in die kooperierende Igelstation nach Berlin gebracht wurde. Bisher wurden im Zeitraum 2001-2010 keine endemischen FSME-Fälle beim Menschen im Stadtkreis Potsdam und Landkreis Potsdam-Mittelmark beobachtet (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>

20.10.2010). Im Bundesland Brandenburg ist die Anzahl menschlicher Neuinfektionen im Vergleich zu Süddeutschland, wie Bayern oder Baden-Württemberg, sehr gering. Im Zeitraum 2001-2010 verzeichnete das Robert-Koch Institut dort nur 14 FSME-Fälle (Robert Koch-Institut: SurvStat, <http://www3.rki.de/SurvStat>, 20.10.2010). Die Untersuchung an Igel zeigt aber, dass FSME-Viren in Brandenburg endemisch vorkommen, obwohl aktuelle FSME-Karten den Stadt- und Landkreis Potsdam-Mittelmark nicht als Risikogebiet kennzeichnen (Abbildung 36).

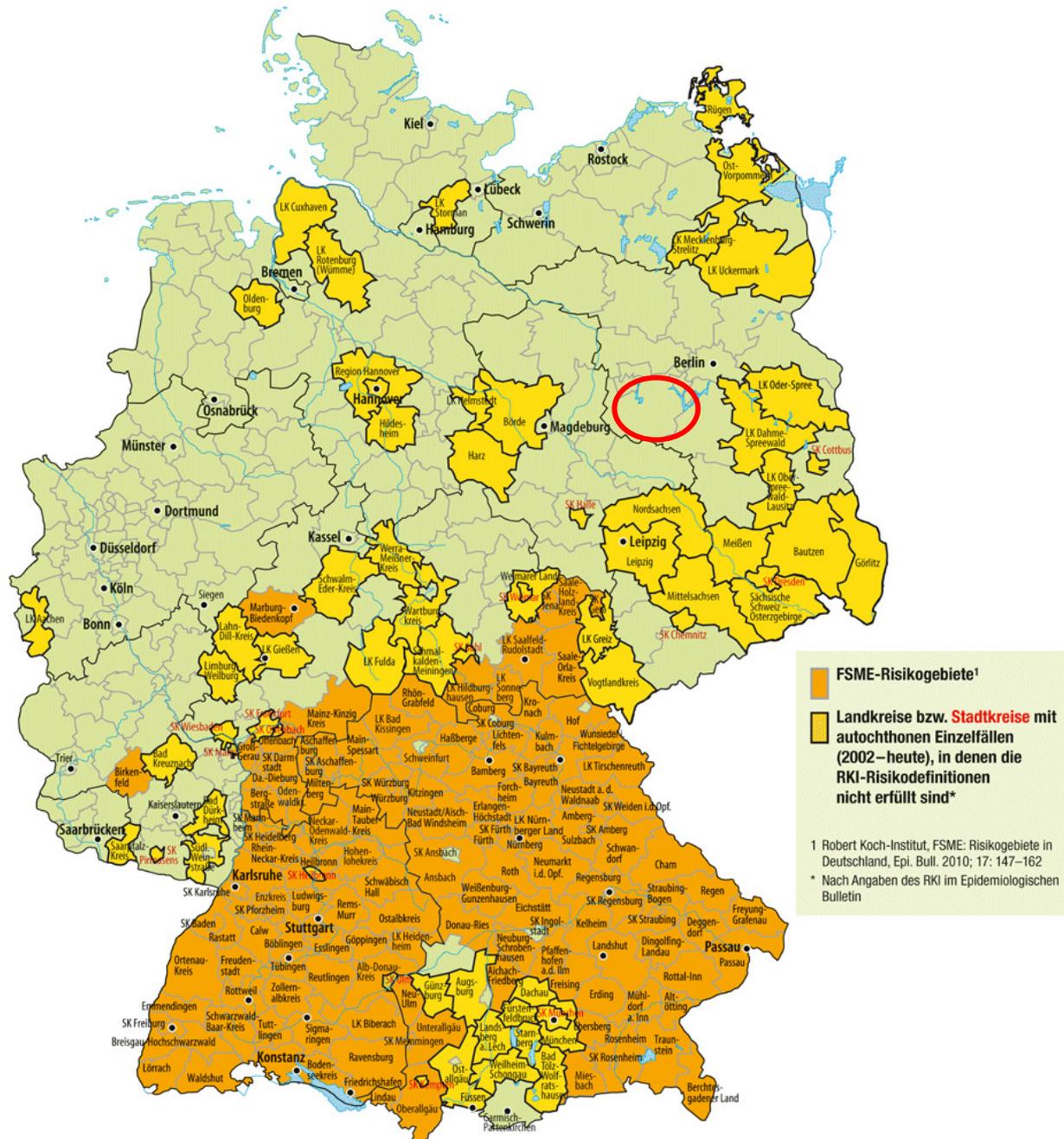


Abbildung 36: FSME-Risikogebiete in Deutschland. Der Landkreis Potsdam-Mittelmark ist rot eingekreist. Quelle: <http://www.impfserviceplus.de/zecken/fsme/00023/index.html>; 22.02.2011, modifiziert.

Generell ist die Prävalenz von FSME-Viren in Zecken im Vergleich zu anderen zeckenübertragenen Erregern sehr gering. Selbst in Hochrisikogebieten wie Baden-Württemberg liegt die Prävalenz in *Ixodes ricinus* nur bei 0-5 % (Eistetter et al. 1998, Oehme et al. 2002). Im Großraum Stuttgart und Pforzheim lagen die Werte bei 0,3-0,8 % (n=3488) bzw. bei 0-0,5 % (n=1054) (Oehme et al. 2002). Die höchsten Werte wurden im Gebiet des Schwarzwaldes mit 3,4 % (Nymphen) und 4,8 % (Adulte) ermittelt (Maier et al. 2003).

Der Zeitpunkt der Virämie des untersuchten Igels deckt sich mit der Studie von Kozuch et al. (1967), bei der FSME-Viren aus einem juvenilen und einem adulten Igel ebenfalls Ende Mai isoliert werden konnte. Die Jahreszeit April bis Juni gilt als Hauptsaison für das Zirkulieren von FSME-Viren in endemischen Naturherden, da zum einen viele *I. ricinus* Zecken aktiv sind, aber zum anderen auch viele empfängliche Nagetierwirte geboren werden (Blaskovic & Nosek 1972). Im September/Okttober kommt es zu einem zweiten, weniger ausgeprägten Peak in der Abundanz von *I. ricinus*, weshalb auch in diesem Zeitraum mit der Zirkulation von FSME-Viren in Naturherden zu rechnen ist. Insbesondere juvenile Igel könnten in diesem Zeitraum dann anfällig für eine Virus-Infektion sein und eine Virämie ausbilden. Hinsichtlich der Pathogenität wird angenommen, dass FSME-Virus Infektionen bei Wildtieren nur geringfügig mit klinischen Symptomen in Erscheinung treten (Kahl & Radda 1988, Foppa 2005).

Das Zirkulieren von FSME-Viren kann in einem Untersuchungsareal hinsichtlich der Jahreszeit, in Abhängigkeit von der Zecken- und Wirtstierpopulation und zusätzlichen Faktoren erheblichen Schwankungen unterworfen sein (Nosek & Grulich 1967, Blaskovic & Nosek 1972).

Als hauptsächliche Reservoirwirte für FSME-Viren gelten kleine Säugetiere. Insbesondere Nagetierarten, die durch eine hohe Reproduktionsrate mit zyklisch wiederkehrenden Fluktuationen innerhalb der Population (durchschnittlich 3-6 Monate) gekennzeichnet sind, bringen viele empfängliche Nachkommen hervor, die als naive Wirte anfällig für eine Infektion sind und somit viele infizierte Zecken in einem Habitat beisteuern (Blaskovic & Nosek 1972). Dabei sind die verschiedenen Mäusespezies unterschiedlich an der Verbreitung infektiöser Zecken beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Gelbhalsmäuse das Virus auf 80 %, Feldmäuse auf 68 % und Rötelmäuse nur auf etwa 28 % der saugenden Zecken übertrugen (Labuda et al. 1997).

Blaskovic & Nosek (1972) listen den Igel als Reservoirwirt für FSME-Viren auf. Die Untersuchung von Kozuch et al. (1966) zeigte, dass sich Zecken während des Saugaktes an Igeln infizieren können. Allgemein sind Wirbeltierwirte nur über eine kurze Zeitdauer virämisch (Radda et al. 1968, Foppa 2005). Insbesondere Tierarten mit einer hohen Stoffwechselrate, wie Spitzmäuse, Maulwürfe und Wühlmäuse (*Apodemus* spp. und *Microtus* spp.), bilden nach dem Stich einer infizierten Zecke eine hohe Virämie aus (Blaskovic & Nosek 1972). Eine Virämie in Igeln dauerte 2 bis 8 Tage und erreichte die höchste Titerstufe am 7. Tag nach dem Zeckenstich einer infizierten Nymphe (Kozuch et al. 1966). Interessanterweise kann die Länge der Virämie in Igeln je nach Jahreszeit variieren. In Van Tongerens (1959) Experimenten dauerte die Virämie im Sommer 3 bis 6 Tage, im Herbst dagegen zwischen 8 und 14 Tagen (Blaskovic & Nosek 1972). Angesichts der kurzen Infektionsdauer ist die Wahrscheinlichkeit, einen akut erkrankten Igel in der PCR als positiv zu testen, nur sehr gering, was auch eine mögliche Erklärung für die niedrigen FSME-Virus Prävalenzen in den Igelorganpools darstellt. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass zum Zeitpunkt einer Virämie von Igeln ein erhöhtes Risiko für die Verbreitung infizierter Zecken ausgeht.

Blaskovic & Nosek (1972) vermuten, dass Tierarten mit einer niedrigen, aber konstanten Populationsdichte und Reproduktionsrate, wie Igel, Maulwürfe oder Spitzmäuse zwar für FSME-Viren empfänglich, aber im Vergleich zu Mäusepopulationen aufgrund der geringen Dichte nur sekundär an deren Verbreitung beteiligt sind. Dennoch spielen winterschlafende Tiere wie Igel und Schläfer eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung des Zyklus während der Wintermonate (Blaskovic & Nosek 1972). Die Persistenz von FSME-Viren in Igeln während des Winterschlafes konnte bereits von Van Tongeren (1959) und Kozuch et al. (1963) demonstriert werden (Blaskovic & Nosek 1972).

#### **5.4.2.2 Serologischer Nachweis**

Es konnten keine spezifischen Antikörper gegen FSME-Viren bei 90 Igeln mithilfe des Immunozyms FSME (TBE) IgG-All Species Kit nachgewiesen werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den Igelseren aus den Igelstationen teilweise um Seren von sehr jungen Tieren handelte, die möglicherweise noch nie in Kontakt mit infizierten Zecken gekommen sind. Allerdings wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest einige Seren von mehrjährigen Tieren aus dem „Igelgarten“ in Karlsruhe Antikörpertiter aufweisen.

Karlsruhe zählt wie die meisten Landkreise in Baden-Württemberg zu den

Hochrisikogebieten (Abbildung 36). Möglicherweise ist dieses Testkit auch nicht für Igelseren geeignet.

Es ist erwiesen, dass wild lebende Tiere in natürlichen FSME-Foci nach dem Stich einer infizierten Zecke spezifische Antikörper entwickeln (Blaskovic & Nosek 1972). Der Antikörpertiter ist dabei abhängig von der Virusdosis, der Fähigkeit eines Wirtsindividuums, Antikörper zu synthetisieren und der Anzahl der Reinfektionen (Booster Effekt). Einmal infizierte Tiere bleiben zeitlebens immun und entwickeln nach einem wiederholten Kontakt keine Virämie mehr, weshalb sich Zecken nicht mehr an ihnen infizieren können (Blaskovic & Nosek 1972). Damit FSME-Viren auch in Gebieten mit überwiegend immunen Wirtstieren zirkulieren können, gehen einige Autoren davon aus, dass der Übertragungsmechanismus des Co-feedings unabhängig von virämischen Wirtstieren für das Überleben des Virus von Bedeutung ist (Labuda et al. 1997).

Die Möglichkeit einer Reinfektion ist bei kurzlebigen Tieren, wie beispielsweise Mäusen, nur sehr gering und damit die Immunität von diesen Tieren nur von untergeordneter Bedeutung (Kozuch et al. 1967). Dagegen stellt die Immunität bei langlebigen Wirtstieren, wie beispielsweise Igel, einen wichtigen limitierenden Faktor in der Zirkulation des Virus dar. Insgesamt hat daher das Verhältnis von empfänglichen zu immunen Tieren in einem bestimmten Habitat einen ganz entscheidenden Einfluss auf die Zirkulation des Virus zu einem bestimmten Zeitpunkt (Blaskovic & Nosek 1972).

## 5.5 Mischinfektionen von Erregern in Zecken und Wirtstieren

Zecken mit einer polyphagen Lebensweise sorgen für einen ständigen Austausch von Pathogenen innerhalb verschiedener Wirbeltierklassen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass verschiedene Erregerkombinationen in *Ixodes ricinus* detektierbar sind (Christova et al. 2001, Oehme et al. 2002, Barandika et al. 2008, Milutinović et al. 2008, Tomanović et al. 2010, Reis et al. 2010).

In der vorliegenden Studie wurde DNA von *Anaplasma phagocytophilum* und *Borrelia burgdorferi* s.l. sowohl im Wirtstier Igel als auch in vollgesogenen Zecken detektiert. Die Kombination von *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* s.l. scheint weit verbreitet zu sein und wurde bereits von mehreren Autoren in *I. ricinus* beschrieben (Fingerle et al. 1999, Hildebrandt et al. 2003, Skotarczak et al. 2003, Kybicova et al. 2009, Wójcik-Fatla et

al. 2009, Tomanović et al. 2010). Interessanterweise setzen sich diese Kombinationen häufig aus *A. phagocytophilum* und *B. afzelii* bzw. *B. garinii* (*B. bavariensis*) zusammen, was für einen gemeinsamen Kleinsäuger-Zyklus spricht. Wie die vorgestellten Ergebnisse zeigen, waren 3 Igel mit mehreren Genospezies des *B. burgdorferi* s.l. Komplexes und *A. phagocytophilum* koinfiziert, was auch ein erhöhtes Übertragungsrisiko von multiplen Infektionen auf saugende Zecken darstellt.

Es ist bekannt, dass Mischinfektionen zu schweren Krankheitsverläufen bei Menschen und domestizierten Tieren führen und Probleme bei der Diagnostik und Behandlung mit sich bringen können (Krause et al. 2002, Swanson et al. 2006). Korenberg (2004) vermutet, dass durch die Fähigkeit der Erreger sich in verschiedene Organe und Gewebe einzunischen, prinzipiell jede Mischinfektion möglich ist. In Abhängigkeit der Reservoirkompetenz finden sich in Wirtstieren allerdings bevorzugt bestimmte Kombinationen.

Im Vergleich zu nachgewiesenen Mischinfektionen in Zecken ist die Datenlage zum direkten Nachweis von Mischinfektionen aus Säugetieren bislang unzureichend. In erster Linie wurden Mischinfektionen mit verschiedenen *Borrelia*-Genospezies beschrieben (Nakao & Miyamoto 1995, Humair & Gern 1998, Kurtenbach et al. 1998 a). Bei einer Untersuchung aus der Slowakei wurde in 1,8 % der Ohrbiopsien von Kleinsäugetieren eine Koinfektion von *A. phagocytophilum* und Borrelien detektiert (Stefančíková et al. 2008).

Nieto et al. (2010) dokumentierten in den USA die Kombination von *B. burgdorferi* und *A. phagocytophilum* zu 14 % in untersuchten Grauhörnchen (*Sciurus griseus*). In Ratten (*Rattus rattus*) in Bulgarien wurden Mischinfektionen von *Francisella tularensis* mit *A. phagocytophilum* zu 3 % und mit *F. tularensis*/*B. burgdorferi* s.l. zu 6 % detektiert (Christova & Gladnishka 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnten meist keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Zeckenlast bzw. den Infektionsstatus der Zecken von Sektionsigeln gezogen werden, da Ektoparasiten meist als erste Maßnahme in Igelstationen entfernt und vernichtet werden.

Die Untersuchung der Zecken und der Organproben des Igels Nr. P4 demonstriert allerdings, dass ein Tier mit nachweisbaren Mischinfektionen der Organe auch einen hohen Prozentsatz infizierter Zecken beisteuert. Es ist davon auszugehen, dass die Infektion der Zecken am Tier erfolgte, da auch viele Larvenpools positiv auf die Erreger *A. phagocytophilum* und *B. burgdorferi* s.l. getestet wurden, bei denen die transovariable Übertragung nur eine untergeordnete Rolle spielt. Viele Zeckenpools waren auch mit Rickettsien infiziert, weshalb auch mit Mehrfachinfektionen der genannten Erreger in Zecken und Wirtstieren zu rechnen ist.

## 6 Fazit und Ausblick

Aktuelle Beispiele wie die Schweinepest oder die Vogelgrippe verdeutlichen, dass Tiere häufig ein Reservoir für vielfältige Krankheitserreger darstellen und so oft Auslöser von epidemieartig auftretenden Erkrankungen beim Menschen sind. Daher ist es umso wichtiger, die komplexen ökologischen Zusammenhänge zwischen Erregern und möglichen Reservoiren zu verstehen.

Die vorliegende Studie erbrachte wichtige Hinweise in Bezug auf die Rolle des Igels in der Epidemiologie von zeckenübertragenen Erregern, insbesondere von Borrelien.

Die Ergebnisse der *Borrelia*-Untersuchung führen zur Annahme, dass Igelindividuen insbesondere Jungtiere bzw. Tiere mit einem niedrigen Immunstatus, eine Bakteriämie mit Organbeteiligung ausbilden und so vermehrt zu infizierten Zecken in einem Habitat beitragen können. Die molekularbiologische Untersuchungen der Organproben belegen, dass *Borrelia afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* in der Lage sind, von der Haut in innere Organe des Igels zu disseminieren. Diese Genospezies scheinen gegenüber den Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr dieses Wirtstieres bei erstmaligem Kontakt resistent zu sein, was für eine Reservoirwirtfunktion spricht. Die Reservoirkompetenz des Igels für *B. afzelii* und *B. spielmanii* konnte auch durch Xenodiagnose bestätigt werden.

Bei einer wiederholten Zecken- und Erregerexposition kommt es zu einer starken spezifischen Immunantwort gegen Borrelien, wodurch die Reservoirkompetenz des Igels erheblich abnimmt. Borrelien werden möglicherweise schon während des Saugakts in den infizierten Zecken abgetötet, was zu einem Verdünnungseffekt („dilution effect“) in einem Gebiet führen könnte. Der Verdünnungseffekt wurde demonstriert, indem reservoir-kompetente Weißfußmäuse durch immunisierte, reservoir-inkompetente Weißfußmäuse in einem Habitat ersetzt wurden, was eine massive Erniedrigung der Infektionsrate von *B. burgdorferi* in Zecken zur Folge hatte (Tsao et al. 2004). Die niedrige *Borrelia*-Prävalenz der Igelzecke *Ixodes hexagonus* könnte ebenfalls in Zusammenhang mit dieser Immunisierung stehen.

Zusammenfassend ist der entwickelte ELISA mit anschließendem Immunblot unter der Verwendung des Protein G-Peroxidase-Konjugates hervorragend zur Analyse von Igelseren geeignet und könnte auch in zukünftigen epidemiologischen Untersuchungen von Igel und anderen Kleinsäugetern Anwendung finden. Es wäre denkbar, mit der entwickelten Blutabnahme-Technik in Verbindung mit dem etablierten serologischen Testsystem, Igel als „Sentinel-Tiere“ in Überwachungsprogrammen für Borrelien einzusetzen. Sentinels sind

Anzeigertiere, die serologisch untersucht werden, um festzustellen, ob Infektionserreger in einem bestimmten Gebiet vorhanden sind (Gill et al. 1994, Goossens et al. 2001).

Auch für andere Infektionserreger wie *Anaplasma phagocytophilum* stellt der Igel ein wichtiges Reservoir dar. Es zeigte sich, dass der Igel insbesondere zur Verbreitung einer igelspezifischen *A. phagocytophilum* Variante beiträgt, aber auch für andere Varianten empfänglich ist. Ob diese Igelvariante von *A. phagocytophilum* auch für den Menschen pathogen ist, muss durch eine weitere Charakterisierung geklärt werden.

Während in den Organpools von Igeln keine Rickettsien nachgewiesen wurden, waren alle 3 Entwicklungsstadien von *Ixodes hexagonus* und *I. ricinus* in starkem Maße mit Rickettsien infiziert. Die stichprobenartig durchgeführte Sequenzierung belegt die Beteiligung des Igels und seiner Zecken bei der Verbreitung von *Rickettsia helvetica* (Perseke 2010).

Bei einem Igel konnten FSME-Viren molekularbiologisch in der Niere nachgewiesen werden, was die Involvierung des Igels auch im Kreislauf von zeckenübertragenen Viren demonstriert. Die hier vorgestellten epidemiologischen Daten erfahren in ihrer Aussagekraft insofern eine Einschränkung, dass vorwiegend Tiere aus Igelstationen untersucht wurden. In Igelstationen werden primär kranke, verletzte und juvenile Tiere behandelt, die durch den schlechten Allgemeinzustand eine Prädisposition für Zecken und Pathogene haben könnten. Dennoch gelang es mithilfe dieser Tiere, ein grundlegendes Basiswissen über zoonotische Erreger beim Igel zu gewinnen.

Die Problematik zeckenübertragener Pathogene könnte durch den in den nächsten Jahrzehnten zu erwartenden Klimawandel noch verschärft werden. Der Klimawandel wird als wichtiger Faktor bei der Ausbreitung von vektorübertragenen Erregern angesehen (Maier et al. 2003). Durch die Klimaerwärmung und die zunehmende Globalisierung kann es zur Ausbreitung und Etablierung von Vektoren aus dem Süden und den damit verbundenen Krankheitserregern kommen. Die Braune Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus*) wird beispielsweise durch den Transport von Hunden aus dem Mittelmeerraum des Öfteren nach Deutschland eingeschleppt. Zwar kann sie derzeit noch keine Freilandpopulationen ausbilden, allerdings könnten klimatisch begünstigte Gebiete wie die Rheinebene in naher Zukunft davon betroffen sein. Angesichts dieser Möglichkeit könnten auch Igel in West- und Mitteleuropa zur Verbreitung humanpathogener Erreger beitragen, die ursprünglich aus weiter südlich gelegenen Ländern stammen (z.B. *Rickettsia conorii*). Zusammenfassend ist es daher zwingend notwendig, den Igel als Wirtstier für weitere Pathogene zu untersuchen. Zusätzlich sollten neben Zecken auch weitere Vektoren wie Milben, Flöhe und Stechmücken einbezogen werden, um die Datenlage hinsichtlich zoonotischer Erreger bei Igeln zu verbessern.

## 7 Literatur

Aberer, E., 2007. Lyme borreliosis-an update. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 5, 406-414.

Aguirre, E., Tesouro, M.A., Amusatogui, I., Rodríguez-Franco, F., Sainz, A., 2004. Assessment of feline ehrlichiosis in central Spain using serology and a polymerase chain reaction technique. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026, 103-105.

Aktas, M., Vatansever, Z., Altay, K., Aydin, M.F., Dumanli, N., 2010. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 104, 10-15.

Alberdi, M.P., Walker, A.R., Urquhart, K.A., 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiology and Infection* 124, 315-323.

Alitalo, A., Meri, T., Ramo, L., Jokiranta, T.S., Heikkila, T., Seppala, I.J.T., Oksi, J., Viljanen, M., Meri, S., 2001. Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infection and Immunity* 69, 3685-3691.

Anderson, R.M., May, R.M., 1991. *Infectious diseases of humans: dynamics and control*. Oxford University Press, Oxford.

Arthur, D.R., 1963. *British ticks*. Butterworth, London.

Aspöck, H., 2008. Durch Arthropoden übertragene Erreger von Infektionen des Menschen in Mitteleuropa—ein Update. *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft zur Allgemeinen Angewandten Entomologie* 16, 371-392.

Attrasheuskaya, A.V., Fredeking, T.M., Ignatyev, G.M., 2003. Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clinical and Experimental Immunology* 131, 148–154.

Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2006. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 236-247.

Baldrige, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2009. Transovarial transmission of *Francisella*-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *International Journal of Medical Entomology* 46, 625-632.

Balmelli, T., Piffaretti, J.C., 1995. Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Research in Microbiology* 146, 329-340.

- Balogh, Z., Ferenczi, E., Szeles, K., Stefanoff, P., Gut, W., Szomor, K.N., Takacs, M., Berencsi, G., 2010. Tick-borne encephalitis outbreak in Hungary due to consumption of raw goat milk. *Journal of Virological Methods* 163, 481-485.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from Northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8, 829-836.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., Grimont, P.A., 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 378-383.
- Baranton, G., De Martino, S.J., 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), *Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects*. Karger-Verlag, Basel, S. 1-17.
- Barbet, A.F., Yi, J., Lundgren, A., McEwen, B.R., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2001. Antigenic variation of *Anaplasma marginale*: major surface protein 2 diversity during cyclic transmission between ticks and cattle. *Infection and Immunity* 69, 3057-3066.
- Barbour, A.G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A.G., Diuk-Wasser, M.A., Fish, D., Tsao, J.I., 2009. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 1120-1131.
- Barker, S.C., Murrell, A., 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology* 129, 15-36.
- Barlough, J.E., Madigan, J.E., DeRock, E., Dumler, J.S., Bakken, J.S., 1995. Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic *Ehrlichia* (HGE agent). *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3333-3334.
- Barrs, V.R., Beatty, J.A., Wilson, B.J., Evans, N., Gowan, R., Baral, R.M., Lingard, A.E., Perkovic, G., Hawley, J.R., Lappin, M.R., 2010. Prevalence of *Bartonella* species, *Rickettsia felis*, haemoplasmas and the *Ehrlichia* group in the blood of cats and fleas in eastern Australia. *Australian Veterinary Journal* 88, 160-165.
- Barutzki, D., De Nicola, A., Zeziola, M., Reule, M., 2006. Seroprävalenz der *Anaplasma phagocytophilum* Infektion bei Hunden in Deutschland. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 119, 342-347.
- Beati, L., Péter, O., Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Raoult, D., 1993. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43, 521-526.
- Beck, W., 2007. Endoparasiten beim Igel. *Wiener Klinische Wochenschrift* 119, 40-44.
- Beck, W., Pantchev, N. (Hrsg.), 2005. *Praktische Parasitologie bei Heimtieren: Kleinsäuger-Vögel- Reptilien- Bienen*. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover.

- Beichel, E., Petney, T.N., Hassler, D., Brückner, M., Maiwald, M., 1996. Tick infestation patterns and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks collected at a veterinary clinic in Germany. *Veterinary Parasitology* 65, 147-155.
- Bernasconi, M.V., Valsangiacomo, C., Balmelli, T., Péter, O., Piffaretti, J.C., 1997. Tick zoonoses in the southern part of Switzerland (Canton Ticino): occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* sp. *European Journal of Epidemiology* 13, 209-215.
- Berns, S., 1983. Untersuchungen über die Physiologie, Biologie und Krankheiten des Igels (*Erinaceus europaeus*). Dissertation, Universität Gießen, Gießen.
- Bhide, M.R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., Levkut, M., 2005. Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43, 165-172.
- Billeter, S.A., Spencer, J.A., Griffin, B., Dykstra, C.C., Blagburn, B.L., 2007. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. *Veterinary Parasitology* 147, 194-198.
- Bitam, I., Raoult, D., 2009. Other tick-borne diseases in Europe, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), *Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects*. Karger-Verlag, Basel, S. 130-154.
- Björck, L., Kronvall, G., 1984. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *Journal of Immunology* 133, 969-974.
- Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 763-772.
- Blaskovic, D., Nosek, J., 1972. The ecological approach to the study of tick-borne encephalitis. *Progress in Medical Virology* 14, 275-320.
- Boag, B., Fowler, P.A., 1988. The prevalence of helminth parasites from the hedgehog *Erinaceus europaeus* in Great Britain. *Journal of Zoology* 215, 379-382.
- Bogdan, C., 2009. *Rickettsiaceae (Rickettsia, Orientia)*, *Anaplasmataceae (Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia)* und *Coxiellaceae*, in: Hahn, H., Kaufmann, S., Schulz, T., Suerbaum, S. (Hrsg.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer-Verlag, Heidelberg, S. 393-401.
- Bogdanov, A.S., Bannikova, A.A., Piruskiĭ, I.M., Formozov, N.A., 2009. The first genetic evidence of hybridization between west European and northern white-breasted hedgehogs (*Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus*) in Moscow Region. *Izvestiia Akademii Nauk. Serii Biologicheskaja* 6, 760-765.
- Boitani, L., Reggiani, G., 1984. Movements and activity patterns of hedgehogs *Erinaceus europaeus* in Mediterranean coastal habitats. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 49, 193-206.

- Boretti, F.S., Perreten, A., Meli, M.L., Cattori, V., Willi, B., Wengi, N., Hornok, S., Honegger, H., Hegglin, D., Woelfel, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2009. Molecular investigations of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans, and *Ixodes* ticks. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 3230-3237.
- Bork, K., Honomichl, K., Hoede, N., 1987. Flohbisse durch *Archaeopsylla erinacei*, den Igel Floh. *Der Hautarzt* 38, 690-692.
- Bown, K.J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., Ogden, N.H., 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 9, 63-70.
- Bown, K.J., Lambin, X., Ogden, N.H., Petrovec, M., Shaw, S.E., Woldehiwet, Z., Birtles, R.J., 2007. High-resolution genetic fingerprinting of European strains of *Anaplasma phagocytophilum* by use of multilocus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1771-1776.
- Bown, K.J., Lambin, X., Telford, G., Heyder-Bruckner, D., Ogden, N.H., Birtles, R.J., 2011. The common shrew (*Sorex araneus*): A neglected host of tick-borne infections? *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 947-953.
- Broom, J.C., Coghlan, J.D., Kmety, E., 1960. *Leptospira bratislava* isolated from a hedgehog in Scotland. *Lancet* 1326-1327.
- Brunet, L.R., Sellitto, C., Spielman, A., Telford, S.R., 1995. Antibody response of the mouse reservoir of *Borrelia burgdorferi* in nature. *Infection and Immunity* 63, 3030-3036.
- Burgdorfer, W., Aeschlimann, A., Peter, O., Hayes, S.F., Philip, R.N., 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Tropica* 36, 357-367.
- Burgdorfer, W., Barbour, A., Hayes, S., Benach, J., Grunwaldt, E., Davis, J., 1982. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317-1319.
- Burkert, S., Rössler, D., Münchhoff, P., Wilske, B., 1996. Development of enzyme-linked immunosorbent assays using recombinant borrelial antigens for serodiagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection. *Medical Microbiology and Immunology* 185, 49-57.
- Callister, S.M., Agger, W.A., Schell, R.F., Brand, K.M., 1989. Efficacy of the urinary bladder for isolation of *Borrelia burgdorferi* from naturally infected, wild *Peromyscus leucopus*. *Journal of Clinical Microbiology* 27, 773-774.
- Camacho, A.T., Pallas, E., Gestal, J.J., Guitián, F.J., Olmeda, A.S., Telford, S.R., Spielman, A., 2003. *Ixodes hexagonus* is the main candidate as vector of *Theileria annae* in northwest Spain. *Veterinary Parasitology* 112, 157-163.
- Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J.C., Baranton, G., Postic, D., 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 25, 441-448.

- Cao, W.C., Zhan, L., He, J., Foley, J.E., De Vlas, S.J., Wu, X.M., Yang, H., Richardus, J.H., Habbema, J.D.F., 2006. Natural *Anaplasma phagocytophilum* infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 664-668.
- Carlyon, J.A., Fikrig, E., 2003. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cellular Microbiology* 5, 743-754.
- Carrade, D.D., Foley, J.E., Borjesson, D.L., Sykes, J.E., 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 1129-1141.
- Casjens, S., 2000. *Borrelia* genomes in the year 2000. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2, 401-410.
- Casjens, S.R., Fraser-Liggett, C.M., Mongodin, E.F., Qiu, W.-G., Dunn, J.J., Luft, B.J., Schutzer, S.E., 2011. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of Bacteriology* 193, 1489-1490.
- Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker, D.H., 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 589-595.
- Childs, J., Shope, R.E., Fish, D., Meslin, F.X., Peters, C.J., Johnson, K., Debess, E., Dennis, D., Jenkins, S., 1998. Emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases* 4, 453-454.
- Chmielewska-Badora, J., Cisak, E., Wójcik-Fatla, A., Zwolinski, J., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2006. Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13, 307-311.
- Christian, A., 2010. Tick infestation (*Ixodes*) on feral mink (*Neovison vison*) in central Germany. *Soil Organisms* 82, 209-216.
- Christova, I., Schouls, L., van de Pol, I., Park, J., Panayotov, S., Lefterova, V., Kantardjiev, T., Dumler, J.S., 2001. High prevalence of granulocytic ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 4172-4174.
- Christova, I., Gladnishka, T., 2005. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12, 149-152.
- Chu, C.-Y., Liu, W., Jiang, B.-G., Wang, D.-M., Jiang, W.-J., Zhao, Q.-M., Zhang, P.-H., Wang, Z.-X., Tang, G.-P., Yang, H., Cao, W.-C., 2008. A novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks of southwestern China. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 3130-3133.
- Ciceroni, L., Pinto, A., Ciarrocchi, S., Ciervo, A., 2006. Current knowledge of rickettsial diseases in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 143-149.

Corbet, G.B., 1988. The family Erinaceidae: a synthesis of its taxonomy, phylogeny, ecology and zoogeography. *Mammal Review* 18, 117–172.

Coutte, L., Botkin, D.J., Gao, L., Norris, S.J., 2009. Detailed analysis of sequence changes occurring during vlsE antigenic variation in the mouse model of *Borrelia burgdorferi* infection. *Public Library of Science Pathogens* 5, 1-14.

Cutler, S.J., 2010. Relapsing fever-a forgotten disease revealed. *Journal of Applied Microbiology* 108, 1115-1122.

Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C.J., Narasimhan, S., Anguita, J., Fikrig, E., 2009. Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell, Host and Microbe* 6, 482-492.

Daniel, M., Dusbábek, F., 1994. Micrometeorological and microhabitat factors affecting maintenance and dissemination of tick-borne diseases in the environment, in: Sonenshine, D.E., Mather, T.N. (Hrsg.), *Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses*. S. 91–138.

Danielová, V., Holubová, J., Pejcoch, M., Daniel, M., 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitologica* 49, 323–325.

Dautel, H., Kahl, O., 1999. Ticks (Acari: Ixodoidea) and their medical importance in the urban environment, in: *Proceedings of the Third International Conference on Urban Pests: 19–22 July 1999*. S. 73–82.

Dautel, H., 2010. Zecken und Temperatur, in: Aspöck, H. (Ed.), *Krank durch Arthropoden-Denisia 30*. Land Oberösterreich, Biologiezentrum/Oberösterreichische Landesmuseen; Linz, Austria, S. 149-170.

Davidson, M.M., Evans, R., Ling, C.L., Wiseman, A.D., Joss, A.W., Ho-Yen, D.O., 1999. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. *International Journal of Medical Microbiology* 48, 59-65.

De la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Chu, F.K., Lutz, H., Meli, M., Von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., 2005. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1309.

De la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28, 275-283.

De la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodríguez, O., Gortázar, C., 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Research in Veterinary Science* 84, 382-386.

De Sousa, R., Edouard-Fournier, P., Santos-Silva, M., Amaro, F., Bacellar, F., Raoult, D., 2006. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75, 727-731.

- Derdáková, M., Dudiòák, V., Brei, B., Brownstein, J.S., Schwartz, I., Fish, D., 2004. Interaction and transmission of two *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in a tick-rodent maintenance system. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6783-6788.
- Derdáková, M., Stefančíková, A., Spitalská, E., Tarageľová, V., Košťálová, T., Hrkľová, G., Kybicová, K., Schánilec, P., Majláthová, V., Várady, M., Peľko, B., 2011. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Veterinary Microbiology*.
- Dizij, A., Kurtenbach, K., 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunology* 17, 177-183.
- Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppli, F., Sievers, M., 2009. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerging Infectious Diseases* 15, 98-100.
- Dobler, G., Wölfel, R., 2009. Fleckfieber und andere Rickettsiosen. Alte und neu auftretende Infektionen in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt* 106, 348-354.
- Donnelly, J., 1987. The ecology of *Ixodes ricinus*. *Public Health Laboratory Service Microbiology Digest* 4, 52-56.
- Duff, J.P., Holmes, J.P., Barlow, A.M., 2010. Surveillance turns to wildlife. *Veterinary Record* 167, 154.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 2145-2165.
- Dumler, J.S., Choi, K.S., Garcia-Garcia, J.C., Barat, N.S., Scorpio, D.G., Garyu, J.W., Grab, D.J., Bakken, J.S., 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1828-1834.
- Dunning Hotopp, J.C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Eisen, J.A., Eisen, J., Seshadri, R., Ren, Q., Wu, M., Utterback, T.R., Smith, S., Lewis, M., Khouri, H., Zhang, C., Niu, H., Lin, Q., Ohashi, N., Zhi, N., Nelson, W., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sundaram, J., Daugherty, S.C., Davidsen, T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Selengut, J.D., Sullivan, S.A., Zafar, N., Zhou, L., Benahmed, F., Forberger, H., Halpin, R., Mulligan, S., Robinson, J., White, O., Rikihisa, Y., Tettelin, H., 2006. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genetics* 2, 209-223.
- Earnhart, C.G., Buckles, E.L., Dumler, J.S., Marconi, R.T., 2005. Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. *Infection and Immunity* 73, 7869-7877.

- Egli, R., 2004. Comparison of physical condition and parasite burdens in rural, suburban and urban hedgehogs *Erinaceus europaeus*: Implications for conservation. Diplomarbeit, Universität Bern, Bern.
- Eistetter, S., Kimmig, P., Oehme, R. (1998) Untersuchungen zur Epidemiologie der FSME in Baden-Württemberg. Bestimmung der Zeckeninfestationsrate mithilfe eines modifizierten PCR-Verfahrens. Bundesgesundheitsblatt 41, 62-66.
- Elfving, K., Olsen, B., Bergström, S., Waldenström, J., Lundkvist, A., Sjöstedt, A., Mejlön, H., Nilsson, K., 2010. Dissemination of spotted fever *Rickettsia* agents in Europe by migrating birds. Public Library of Science One 5, 1-5.
- Embers, M.E., Ramamoorthy, R., Philipp, M.T., 2004. Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. Microbes and Infection 6, 312-318.
- Embers, M.E., Liang, F.T., Howell, J.K., Jacobs, M.B., Purcell, J.E., Norris, S.J., Johnson, B.J.B., Philipp, M.T., 2007. Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete. FEMS Immunology and Medical Microbiology 50, 421-429.
- Engstrom, S.M., Shoop, E., Johnson, R.C., 1995. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. Journal of Clinical Microbiology 33, 419-427.
- Esser, J., 1984. Untersuchungen zur Frage der Bestandsgefährdung des Igels (*Erinaceus europaeus*) in Bayern. Bayerische Akademie für Naturschutz und Landschaftspflege 8, 22-62.
- Estrada-Peña, A., Oteo, J.A., Estrada-Peña, R., Gortazar, C., Osácar, J.J., Moreno, J.A., Castellá, J., 1995. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain. Experimental and Applied Acarology 19, 173-180.
- Estrada-Peña, A., Jongejan, F., 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. Experimental and Applied Acarology 23, 685-715.
- Faulde, M., Hoffmann, G., 2001. Vorkommen und Verhütung vektorassoziierter Erkrankungen des Menschen in Deutschland unter Berücksichtigung zoonotischer Aspekte. Bundesgesundheitsblatt 44, 116-136.
- Felsenfeld, Oscar, 1965. *Borreliae*, human relapsing fever, and parasite-vector-host relationships. Bacteriological Reviews 29, 46-74.
- Fernández-Soto, P., Pérez-Sánchez, R., Encinas-Grandes, A., Sanz, R.A., 2004. Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 23, 648-649.
- Fikrig, E., Barthold, S.W., Kantor, F.S., Flavell, R.A., 1990. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. Science 250, 553-556.

- Fikrig, E., Barthold, S.W., Marcantonio, N., Deponete, K., Kantor, F.S., Flavell, R.A., 1992. Roles of OspA, OspB, and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. *Infection and Immunity* 60, 657-661.
- Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., Wilske, B., 1999. Coexistence of ehrlichiae of the *phagocytophila* group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Medical Microbiology and Immunology* 188, 145-149.
- Fingerle, V., Michel, H., Hettche, G., Hizo-Teufel, C., Wilske, B., 2004. *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. *International Journal of Medical Microbiology* 293 Supplementum 37, 165-166.
- Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.C., Ruzic-Sabljić, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., Pfister, K., Strle, F., Wilske, B., 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Medical Microbiology* 298, 279-290.
- Finkbeiner-Weber, B., 1996. Die Rolle des Igels und seiner Ektoparasiten in der Epidemiologie der Lyme-Borreliose. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Földvári, G., Farkas, R., Lakos, A., 2005. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerging Infectious Diseases* 42, 1794-1795.
- Foley, J., Nieto, N.C., Foley, P., Teglas, M.B., 2008. Co-phylogenetic analysis of *Anaplasma phagocytophilum* and its vectors, *Ixodes* spp. ticks. *Experimental and Applied Acarology* 45, 155-170.
- Foppa, I.M., 2005. The basic reproductive number of tick-borne encephalitis virus. *Journal of Mathematical Biology* 51, 616-628.
- Fournier, P.E., Grunnenberger, F., Jaulhac, B., Gastinger, G., Raoult, D., 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerging Infectious Diseases* 6, 389-392.
- Fraenkel, C.-J., Garpmo, U., Berglund, J., 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 3308-3312.
- Franceschi, C., Forconi, G., Perocco, P., Di Marco, A.T., Prodi, G., 1972. Reticuloendothelial system activity and antibody formation in hibernating hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). *Journal of Experimental Zoology* 180, 105-115.
- Frandsen, F., Bresciani, J., Hansen, H.G., 1995. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Danish rodents. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 103, 247-253.
- Franke, J., Meier, F., Moldenhauer, A., Straube, E., Dorn, W., Hildebrandt, A., 2010. Established and emerging pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from birds on a conservation island in the Baltic Sea. *Medical and Veterinary Entomology* 24, 425-432.

- Franke, J., Hildebrandt, A., Meier, F., Straube, E., Dorn, W., 2011. Prevalence of Lyme disease agents and several emerging pathogens in questing ticks from the German Baltic coast. *International Journal of Medical Entomology* 48, 441-444.
- Franzén, P., Aspan, A., Egenvall, A., Gunnarsson, A., Aberg, L., Pringle, J., 2005. Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19, 232-239.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathley, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M., 1996. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiology and Immunology* 40, 877-881.
- Gaïdamovich, S.Y., Khutoretskaya, N.V., Asyamov, Y.V., Tsyupa, V.I., Mel'nikova, E.E., Calisher, C.H., 1990. Sandfly fever in central Asia and Afghanistan. *Archives of Virology, Supplementum* 1, 287-293.
- Gall, Y., Pfister, K., 2006. Survey on the subject of equine Lyme borreliosis. *International Journal of Medical Microbiology* 296 Supplementum 40, 274-279.
- Gern, L., Toutoungi, L.N., Hu, C.M., Aeschlimann, A., 1991. *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Medical and Veterinary Entomology* 5, 431-435.
- Gern, L., Rais, O., Capiou, C., Hauser, P., Lobet, Y., Simoen, E., Voet, P., Pêtre, J., 1994. Immunization of mice by recombinant OspA preparations and protection against *Borrelia burgdorferi* infection induced by *Ixodes ricinus* tick bites. *Immunology Letters* 39, 249-258.
- Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., Godfroid, E., 1997. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitologica* 44, 309-314.
- Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J.S., Jaenson, T.G., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P.A., 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie* 287, 196-204.
- Gern, L., Humair, P.F., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe, in: Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G. (Hrsg.), *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CAB International, UK/USA, S. 149-174.

- Gern, L., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite* 15, 244-247.
- Gilbert, L., 2010. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia* 162, 217-225.
- Gill, J.S., McLean, R.G., Shriner, R.B., Johnson, R.C., 1994. Serologic surveillance for the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Minnesota by using white-tailed deer as sentinel animals. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 444-451.
- Gilles, J., Just, F.T., Silaghi, C., Pradel, I., Passos, L.M.F., Lengauer, H., Hellmann, K., Pfister, K., 2008. *Rickettsia felis* in fleas, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1294-1296.
- Gilles, J., Silaghi, C., Just, F.T., Pradel, I., Pfister, K., 2009. Polymerase chain reaction detection of *Rickettsia felis*-like organism in *Archaeopsylla erinacei* (Siphonaptera: Pulicidae) from Bavaria, Germany. *International Journal of Medical Entomology* 46, 703-707.
- Gilmore, R.D., Kappel, K.J., Dolan, M.C., Burkot, T.R., Johnson, B.J., 1996. Outer surface protein C (OspC), but not p39, is a protective immunogen against a tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* challenge: evidence for a conformational protective epitope in OspC. *Infection and Immunity* 64, 2234-2239.
- Glatz, M., Fingerle, V., Wilske, B., Ambros-Rudolph, C., Kerl, H., Müllegger, R.R., 2008. Immunoblot analysis of the seroreactivity to recombinant *Borrelia burgdorferi* sensu lato antigens, including VlsE, in the long-term course of treated patients with Erythema migrans. *Dermatology* 216, 93-103.
- Goethert, H.K., Telford, S.R., 2003. Enzootic transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis among cottontail rabbits. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 633-637.
- Golovljova, I., Vene, S., Sjölander, K.B., Vasilenko, V., Plyusnin, A., Lundkvist, A., 2004. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of Medical Virology* 74, 580-588.
- Goossens, H.A., van den Bogaard, A.E., Nohlmans, M.K., 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 844-848.
- Göttner, G., Schulte-Spechtel, U., Hillermann, R., Liegl, G., Wilske, B., Fingerle, V., 2005. Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3602-3609.
- Granquist, E.G., Stuen, S., Lundgren, A.M., Bråten, M., Barbet, A.F., 2008. Outer membrane protein sequence variation in lambs experimentally infected with *Anaplasma phagocytophilum*. *Infection and Immunity* 76, 120-126.

- Granquist, E.G., Bårdsen, K., Bergström, K., Stuen, S., 2010. Variant- and individual dependent nature of persistent *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52, 25.
- Gray, J.S., 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Annual Review of Entomology* 79, 323–333.
- Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki, C., Stein, J., 1992. Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. *International Journal of Medical Entomology* 29, 915-920.
- Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki-Mittman, C., Stein, J., Guy, E., 1994. Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Experimental and Applied Acarology* 18, 485-491.
- Gray, J.S., 2002. Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wiener Klinische Wochenschrift* 114, 473-478.
- Gritsun, T.S., Lashkevich, V.A., Gould, E.A., 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 57, 129–146.
- Grzeszczuk, A., Stańczak, J., 2006. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 309-311.
- Gubler, D.J., 1998. Resurgent vector-borne diseases as a global health problem. *Emerging Infectious Diseases* 4, 442-450.
- Gubler, D.J., 2009. Vector-borne diseases. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 28, 583-588.
- Haas, W., Krause, G., Marcus, U., Stark, K., Ammon, A., Burger, R., 2004. Emerging Infectious Diseases. *Der Internist* 45, 684-692.
- Haes, J., 2003. Generierung eines rekombinanten Immunoblots als Bestätigungstest einer Infektion mit *Borrelia burgdorferi*. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
- Haglund, M., Günther, G., 2003. Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21 Supplementum 1, 11-18.
- Hahn, O., 1986. Der Igel- liebenswertes Stacheltier. Herder-Verlag, Freiburg im Breisgau.
- Hanincová, I., Taragelová, V., Koci, J., Schäfer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman, J., Labuda, M., Kurtenbach, K., 2003. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2825-2830.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J.M., Bowman, A.S., 2004. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. *Immunology* 113, 401-408.

- Hansmann, Y., 2009. Treatment and prevention of Lyme disease, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects. Karger-Verlag, Basel, S. 111-129.
- Hanson, M.S., Edelman, R., 2003. Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease. *Expert Review of Vaccines* 2, 683-703.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., Kimmig, P., 2004. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in southern Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 293, 86-92.
- Hartelt, K., Pluta, S., Oehme, R., Kimmig, P., 2008. Spread of ticks and tick-borne diseases in Germany due to global warming. *Parasitology Research* 103, 109-116.
- Hauser, U., Lehnert, G., Wilske, B., 1999. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2241-2247.
- Heinz, F.X., Kunz, C., 2004. Tick-borne encephalitis and the impact of vaccination. *Archives of Virology. Supplementum* 201-205.
- Herron, M.J., Ericson, M.E., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2005. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1063, 374-382.
- Herzberger, P., Siegel, C., Skerka, C., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., Wilske, B., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Kraiczy, P., 2009. Identification and characterization of the factor H and FHL-1 binding complement regulator-acquiring surface protein 1 of the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Medical Microbiology* 299, 141-154.
- Hildebrandt, A., Schmidt, K.H., Wilske, B., Dorn, W., Straube, E., Fingerle, V., 2003. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22, 364-367.
- Hildebrandt, A., Pauliks, K., Sachse, S., Straube, E., 2010. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Middle Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10, 831-837.
- Hillyard, P.D., 1996. Ticks of North-West Europe., in: Barnes, R.S.K., Crothers, J.H. (Hrsg.), *Synopsis of the British Fauna* 52.
- Hofmann, H., 1996. Lyme borreliosis- Problems of serological diagnosis. *Infection* 24, 470-472.
- Holz, H., Niethammer, J., 1990. Insektenfresser, in: Niethammer, J., Krapp, F. (Hrsg.), *Handbuch Der Säugetiere Europas*. Aula-Verlag, Wiesbaden, S. 20-74.

- Holzmann, H., Aberle, S.W., Stiasny, K., Werner, P., Mischak, A., Zainer, B., Netzer, M., Koppi, S., Bechter, E., Heinz, F.X., 2009. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerging Infectious Diseases* 15, 1671-1673.
- Honzakova, E., 1973. Survival and development of ticks *Ixodes ricinus*, *Ixodes hexagonus* and *Dermacentor marginatus* in the period of maximum summer temperatures. *Folia Parasitologica* 20, 263-266.
- Horak, I.G., 2009. A century of tick taxonomy in South Africa. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 76, 69-74.
- Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Veterinary Microbiology* 140, 98-104.
- Horowitz, H.W., Agüero-Rosenfeld, M., Dumler, J.S., McKenna, D.F., Hsieh, T.C., Wu, J., Schwartz, I., Wormser, G.P., 1998. Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Annals of Internal Medicine* 129, 461-463.
- Horst, H., 1997. Serodiagnostik, in: Horst, H. (Ed.), *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier*. Perimed-Verlag, Lüneburg, S. 128–135.
- Hu, C.M., Wilske, B., Fingerle, V., Lobet, Y., Gern, L., 2001. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1169-1171.
- Hubálek, Z., 1987. Geographic distribution of Bhanja virus. *Folia Parasitologica* 34, 77.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., 1997. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *European Journal of Epidemiology* 13, 951-957.
- Hubálek, Z., Halouzka, J., 1998. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology Research* 84, 167-172.
- Hubálek, Z., 2009. Epidemiology of Lyme borreliosis, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), *Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects*. Karger-Verlag, Basel, S. 31-50.
- Hudson, P.J., Norman, R., Laurenson, M.K., Newborn, D., Gaunt, M., Jones, L., Reid, H., Gould, E., Bowers, R., Dobson, A., 1995. Persistence and transmission of tick-borne viruses: *Ixodes ricinus* and Louping-III virus in Red Grouse populations. *Parasitology* 111, 49-58.
- Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B., Gern, L., 2002. *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4735-4737.
- Humair, P.F., Peter, O., Wallich, R., Gern, L., 1995. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *International Journal of Medical Entomology* 32, 433-438.

- Humair, P.-F., Gern, L., 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Tropica* 69, 213-227.
- Humair, P.-F., Rais, O., Gern, L., 1999. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* 118, 33-42.
- Huppertz, H.I., Böhme, M., Standaert, S.M., Karch, H., Plotkin, S.A., 1999. Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18, 697-703.
- Hutterer, R., 1993. Order Insectivora, in: Wilson, D.E., Reeder, D.A.M. (Hrsg.), *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, Washington, S. 69–130.
- Hutterer, R., 2005. Order Erinaceomorpha, in: Wilson, D.E., Reeder, D.A.M. (Hrsg.), *Mammal species of the world. A geographic and taxonomic reference*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, Washington S. 212–219.
- Inokuma, H., Oyamada, M., Kelly, P.J., Jacobson, L.A., Fournier, P.-E., Itamoto, K., Okuda, M., Brouqui, P., 2005. Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from South Africa. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 2934-2937.
- Inokuma, H., Seino, N., Suzuki, M., Kaji, K., Takahashi, H., Igota, H., Inoue, S., 2008. Detection of *Rickettsia helvetica* DNA from peripheral blood of Sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Journal of Wildlife Diseases* 44, 164-167.
- Isenbügel, E., 1976. Untersuchung, Haltung und Fütterung des Igels. *Collegium veterinarium* 57, 21–27.
- Ismail, N., Bloch, K.C., McBride, J.W., 2010. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clinics in Laboratory Medicine* 30, 261-292.
- Jääskeläinen, A.E., Tikkakoski, T., Uzcátegui, N.Y., Alekseev, A.N., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2006. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerging Infectious Diseases* 12, 1568–1571.
- Jaenson, T.G.T., Eisen, L., Comstedt, P., Mejlom, H.A., Lindgren, E., Bergström, S., Olsen, B., 2009. Risk indicators for the tick *Ixodes ricinus* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Sweden. *Medical and Veterinary Entomology* 23, 226-237.
- Jensen, J., Simon, D., Murua Escobar, H., Escobar, H.M., Soller, J.T., Bullerdiek, J., Beelitz, P., Pfister, K., Nolte, I., 2007. *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. *Zoonoses and Public Health* 54, 94-101.
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, F.W., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 496-497.

- Johnson, R.C., Kodner, C., Russell, M., 1986 a. Passive immunization of hamsters against experimental infection with the Lyme disease spirochete. *Infection and Immunity* 53, 713-714.
- Johnson, R.C., Kodner, C., Russell, M., 1986 b. Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 54, 897-898.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-993.
- Juricová, Z., Hubálek, Z., 2009. Serologic survey of the wild boar (*Sus scrofa*) for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9, 479-482.
- Just, F.T., Gilles, J., Pradel, I., Pfalzer, S., Lengauer, H., Hellmann, K., Pfister, K., 2008. Molecular evidence for *Bartonella* spp. in cat and dog fleas from Germany and France. *Zoonoses and Public Health* 55, 514-520.
- Kahl, O., Radda, A.C., 1988. Occurrence of tick-borne encephalitis (TBE) virus in Berlin (West). *Zentralblatt für Bakteriologie, Series A* 268, 482-486.
- Kahl, O., Janetzki, C., Gray, J.S., Stein, J., Bauch, R.J., 1992. Tick infection rates with *Borrelia: Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. *Medical and Veterinary Entomology* 6, 363-366.
- Kaiser, R., 1999. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: A prospective study of 656 patients. *Brain* 122, 2067-2078.
- Kampen, H., Schöler, A., Metzen, M., Oehme, R., Hartelt, K., Kimmig, P., Maier, W.A., 2004 a. *Neotrombicula autumnalis* (Acari, Trombiculidae) as a vector for *Borrelia burgdorferi* sensu lato? *Experimental and Applied Acarology* 33, 93-102.
- Kampen, H., Rötzel, D.C., Kurtenbach, K., Maier, W.A., Seitz, H.M., 2004 b. Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of Western Germany over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 1576-1582.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y., 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and Immunology* 37, 843-848.
- Kelly, P.J., Tagwira, M., Matthewman, L., Mason, P.R., Wright, E.P., 1993. Reactions of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with protein A and a recombinant chimeric protein AG. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 16, 299-305.
- Khanakah, G., Kocianová, E., Vyrosteková, V., Reháček, J., Kundi, M., Stanek, G., 2006. Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift* 118, 754-758.
- Kimmig, P., Pluta, S., Naucke, T., 2010. Infektionsgefahr aus dem Süden. *Globale Erwärmung. Biologie in unserer Zeit* 40, 21-28.

- Kipp, S., 2008. Wirt-Vektor-Beziehungen und genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Borreliose Naturherden. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
- Kirby, A.D., Smith, A.A., Benton, T.G., Hudson, P.J., 2004. Rising burden of immature sheep ticks (*Ixodes ricinus*) on red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*) chicks in the Scottish uplands. *Medical and Veterinary Entomology* 18, 67-70.
- Kisizza, W.N., McCall, P.J., Mitani, H., Talbert, A., Fukunaga, M., 2003. A newly identified tick-borne *Borrelia* species and relapsing fever in Tanzania. *Lancet* 362, 1283-1284.
- Kjelland, V., Ytrehus, B., Vikørren, T., Stuen, S., Skarpaas, T., Slettan, A., 2011. *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in skin of Norwegian mountain hares (*Lepus timidus*) without signs of dissemination. *Journal of Wildlife Diseases* 47, 293-299.
- Kochi, S.K., Johnson, R.C., Dalmasso, A.P., 1993. Facilitation of complement-dependent killing of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by specific immunoglobulin G Fab antibody fragments. *Infection and Immunity* 61, 2532-2536.
- Kofler, R.M., Heinz, F.X., Mandl, C.W., 2002. Capsid protein C of tick-borne encephalitis virus tolerates large internal deletions and is a favorable target for attenuation of virulence. *Journal of Virology* 76, 3534-3543.
- Kohn, B., Galke, D., Beelitz, P., Pfister, K., 2008. Clinical features of canine granulocytic anaplasmosis in 18 naturally infected dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22, 1289-1295.
- Korenberg, E.I., 2004. Problems in the study and prophylaxis of mixed infections transmitted by ixodid ticks. *International Journal of Medical Microbiology* 293 Supplementum 37, 80-85.
- Kozuch, O., Nosek, J., Ernek, E., Lichard, M., Albrecht, P., 1963. Persistence of tick-borne encephalitis virus in hibernating hedgehogs and dormice. *Acta Virologica* 7, 430-433.
- Kozuch, O., Nosek, J., Lichard, M., 1966. Überleben des Zeckenencephalitisvirus in der Zecke *Ixodes ricinus* und die Übertragung dieses Virus auf den Igel (*Erinaceus roumanicus*). *Zentralblatt für Bakteriologie* 199, 152-161.
- Kozuch, O., Gresíková, M., Nosek, J., Lichard, M., Sekeyová, M., 1967. The role of small rodents and hedgehogs in a natural focus of tick-borne encephalitis. *Bulletin of the World Health Organization* 36, 61-66.
- Krause, A., Fingerle, V., 2009. Lyme-Borreliose. *Zeitschrift für Rheumatologie* 68, 239-254.
- Krause, P.J., McKay, K., Thompson, C.A., Sikand, V.K., Lentz, R., Lepore, T., Closter, L., Christianson, D., Telford, S.R., Persing, D., Radolf, J.D., Spielman, A., 2002. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. *Clinical Infectious Diseases* 34, 1184-1191.
- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B. (Hrsg.), 2003. Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans, 3rd ed. American Society for Microbiology.

Kristiansson, H., 1990. Population variables and causes of mortality in a hedgehog (*Erinaceus europaeus*) population in southern Sweden. *Journal of Zoology* 220, 391–404.

Krivanec, K., Kopecký, J., Tomková, E., Grubhoffer, L., 1988. Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*. *Folia Parasitologica* 35, 273.

Krupka, I., Pantchev, N., Lorentzen, L., Weise, M., Straubinger, R.K., 2007. Durch Zecken übertragbare bakterielle Infektionen bei Hunden: Seroprävalenzen von *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia canis* in Deutschland. *Der Praktische Tierarzt* 13, 776–788.

Krupka, I., Straubinger, R.K., 2010. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 40, 1103-1119.

Kurtenbach, K., Dizij, A., Seitz, H.M., Margos, G., Moter, S.E., Kramer, M.D., Wallich, R., Schaible, U.E., Simon, M.M., 1994. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infection and Immunity* 62, 5344-5352.

Kurtenbach, K., Kampen, H., Dizij, A., Arndt, S., Seitz, H.M., Schaible, U.E., Simon, M.M., 1995. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *International Journal of Medical Entomology* 32, 807.

Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S.G.T., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., Randolph, S.E., 1998 a. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 1169-1174.

Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., Nuttall, P.A., 1998 b. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infection and Immunity* 66, 1248.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P., 2002 a. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement. *Trends in Microbiology* 10, 74–79.

Kurtenbach, K., Schäfer, S.M., Sewell, H.-S., Peacey, M., Hoodless, A., Nuttall, P.A., Randolph, S.E., 2002 b. Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infection and Immunity* 70, 5893-5895.

Kurtenbach, K., Hanincová, K., Tsao, J.I., Margos, G., Fish, D., Ogden, N.H., 2006. Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. *Nature Reviews Microbiology* 4, 660-669.

Kybicová, K., Kurzová, Z., Hulínská, D., 2008. Molecular and serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in wild rodents in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8, 645-652.

- Kybicová, K., Schánilec, P., Hulínská, D., Uherková, L., Kurzová, Z., Spejchalová, S., 2009. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9, 655-661.
- Kycková, K., Kopecký, J., 2006. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *International Journal of Medical Entomology* 43, 1208-1214.
- Labuda, M., Kozuch, O., Zuffová, E., Elecková, E., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235, 138-143.
- Ladbury, G.A.F., Stuen, S., Thomas, R., Bown, K.J., Woldehiwet, Z., Granquist, E.G., Bergström, K., Birtles, R.J., 2008. Dynamic transmission of numerous *Anaplasma phagocytophilum* genotypes among lambs in an infected sheep flock in an area of anaplasmosis endemicity. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 1686-1691.
- Lambert, D., 2003 a. Die Parasiten der Igel–Teil 1: Endoparasiten. *Mikrokosmos* 92, 283-287.
- Lambert, D., 2003 b. Die Parasiten der Igel–Teil 2: Ektoparasiten. *Mikrokosmos* 92, 361-365.
- Lapierre, J., Rousset, J.J., Picot, M., 1959. Sensitivity of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) to different species of *Borrelia*. *Comptes rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 153, 1718-1720.
- Larsen, B., 1972 a. Seasonal variations in serum concentration and half-life of hedgehog IgG2. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 42, 415-423.
- Larsen, B., 1972 b. Antibody activity in various classes of hedgehog immunoglobulins. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 42, 357-366.
- Larsen, B., 1973. Properties of hedgehog immunoglobulin IgG2. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 44, 239-248.
- La Scola, B., Raoult, D., 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2715-2727.
- Lawrie, C.H., Randolph, S.E., Nuttall, P.A., 1999. *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology* 93, 207-214.
- Le Duc, J.W., 1979. The ecology of California group viruses. *International Journal of Medical Entomology* 16, 1-17.
- Lee, B.H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Aktas, M., Okumura, M., Tsuchiya, K., Kariwa, H., Arikawa, J., 2003. Detection of antibody for the serodiagnosis of hantavirus infection in different rodent species. *Archives of Virology* 148, 1885-1897.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., Baranton, G., 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 921-925.

- Le Gac, P., 1974. Importance du role du lapin de garenne (*Oryctolagus cuiculus*) dans l'épidemiologie des rickettsiosis. Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales 67, 261-266.
- Lencáková, D., Hizo-Teufel, C., Petko, B., Schulte-Spechtel, U., Stanko, M., Wilske, B., Fingerle, V., 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. International Journal of Medical Microbiology 296 Supplementum 40, 108-118.
- Levin, M.L., Fish, D., 2000. Immunity reduces reservoir host competence of *Peromyscus leucopus* for *Ehrlichia phagocytophila*. Infection and Immunity 68, 1514-1518.
- Levin, M.L., Fish, D., 2001. Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 1, 139-148.
- Levin, M.L., Nicholson, W.L., Massung, R.F., Sumner, J.W., Fish, D., 2002. Comparison of the reservoir competence of medium-sized mammals and *Peromyscus leucopus* for *Anaplasma phagocytophilum* in Connecticut. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2, 125-136.
- Liang, F.T., Yan, J., Mbow, M.L., Sviat, S.L., Gilmore, R.D., Mamula, M., Fikrig, E., 2004. *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. Infection and Immunity 72, 5759-5767.
- Liebisch, A., Rahman, M.S., 1976. Zum Vorkommen und zur Ökologie einiger human- und veterinärmedizinisch wichtiger Zeckenarten (Ixodidae) in Deutschland. Zeitschrift für Angewandte Entomologie 82, 29-37.
- Liebisch, A., Olbrich, S., Brand, A., Liebisch, M., Mourettou-Kunitz, M., 1989. Natürliche Infektionen der Zeckenart *Ixodes hexagonus* mit Borrelien (*Borrelia burgdorferi*). Tierärztliche Umschau 44, 809-810.
- Liebisch, A., 1991. Biologie und Ökologie der Zecken, in: Horst, H. (Ed.), Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. Perimed-Verlag, Lüneburg, S. 31-47.
- Liebisch, A., Olbrich, S., 1991. Epidemiologische Untersuchungen zum Befall von Zecken mit Borreliose-Erregern von Kleinsäugetern aus Norddeutschland. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 98, 228-230.
- Liebisch, G., Sohns, B., Bautsch, W., 1998. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. Journal of Clinical Microbiology 36, 3355.
- Lienhardt, G., 1979. Beobachtungen zum Verhalten des Igels (*Erinaceus europaeus*) und seine Überlebenschancen im heutigen Biotop. Zoologische Beiträge 25, 447-484.

- Lindgren, E., Jaenson, T.G.T., 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology and adaptation measures, in: Menne, B., Ebi, K.L. (Hrsg.), Climate Change and Adaption Strategies for Human Health. Steinkopff-Verlag, Darmstadt, S. 157-188.
- Lindquist, L., Vapalahti, O., 2008. Tick-borne encephalitis. Lancet 371, 1861-1871.
- Ling, C.L., Joss, A.W., Davidson, M.M., Ho-Yen, D.O., 2000. Identification of different *Borrelia burgdorferi* genomic groups from Scottish ticks. Molecular Pathology 53, 94-98.
- Lipsker, D., Jaulhac, B., 2009. Preface, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects. Karger-Verlag, Basel.
- Liz, J.S., 2002. Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. International Journal of Medical Microbiology 291 Supplementum 33, 104-105.
- MacLeod, J., 1935. *Ixodes ricinus* in relation to its physical environment. Parasitology 27, 123-144.
- Maetzel, D., Maier, W.A., Kampen, H., 2005. *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. Parasitology Research 95, 5-12.
- Maier, W.A., Grunewald, J., Habedank, B., Hartelt, K., Kampen, H., Kimmig, P., Naucke, T., Oehme, R., Vollmer, A., Schöler, A., Schmitt, C., 2003. Mögliche Auswirkungen von Klimaveränderungen auf die Ausbreitung von primär humanmedizinisch relevanten Krankheitserregern über tierische Vektoren sowie auf die wichtigen Humanparasiten in Deutschland. Forschungsbericht 20061218/11, Umweltbundesamt.
- Maiwald, M., Petney, T.N., Brückner, M., Krämer, C., Röhler, B., Beichel, E., Hassler, D., 1995. Untersuchungen zur natürlichen Epidemiologie der Lyme-Borreliose anlässlich des gehäufteten Auftretens von Erkrankungen in einem Vorort einer nordbadischen Gemeinde. Das Gesundheitswesen 57, 419-425.
- Majeed, S.K., Morris, P.A., Cooper, J.E., 1989. Occurrence of the lungworms *Capillaria* and *Crenosoma* spp. in British hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). Journal of Comparative Pathology 100, 27-36.
- Mandl, C.W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. Virus Research 111, 161-174.
- Mansfield, K.L., Johnson, N., Phipps, L.P., Stephenson, J.R., Fooks, A.R., Solomon, T., 2009. Tick-borne encephalitis virus- a review of an emerging zoonosis. Journal of General Virology 90, 1781-1794.
- Maraspin, V., Ruzic-Sabljić, E., Dias, F., 2002. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. Wiener Klinische Wochenschrift 114, 493-497.

- Marconi, R.T., Liveris, D., Schwartz, I., 1995. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2427-2434.
- Marconi, R.T., Hohenberger, S., Jauris-Heipke, S., Schulte-Spechtel, U., LaVoie, C.P., Rössler, D., Wilske, B., 1999. Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3965-3970.
- Margos, G., Vollmer, S.A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Drancourt, M., Kurtenbach, K., 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5410-5416.
- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R.S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D.M., Fish, D., Piesman, J., 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1, 151-158.
- Massung, R.F., Mauel, M.J., Owens, J.H., Allan, N., Courtney, J.W., Stafford, K.C., Mather, T.N., 2002. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* 8, 467-472.
- Massung, R.F., Slater, K.G., 2003. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 717-722.
- Massung, R.F., Levin, M.L., Munderloh, U.G., Silverman, D.J., Lynch, M.J., Gaywee, J.K., Kurtti, T.J., 2007. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2138-2143.4
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T., 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1817-1824.
- Masuzawa, T., 2004. Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57, 229-235.
- Mather, T.N., Wilson, M.L., Moore, S.I., Ribeiro, J.M., Spielman, A., 1989. Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *American Journal of Epidemiology* 130, 143-150.
- Matsumoto, K., Grzeszczuk, A., Brouqui, P., Raoult, D., 2009. *Rickettsia raoultii* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from Bialowieza Primeval Forest European bison (*Bison bonasus bonasus*), Poland. *Clinical Microbiology and Infection* 15 Supplementum 2, 286-287.

- Matuschka, F.R., Endepols, S., Richter, D., Spielman, A., 1997. Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *International Journal of Medical Entomology* 34, 489-493.
- Mavin, S., McDonagh, S., Evans, R., Milner, R.M., Chatterton, J.M.W., Ho-Yen, D.O., 2011. Immunoblot interpretation criteria in Western blot diagnosis of Lyme borreliosis. *British Journal of Biomedical Science* 68, 5-10.
- Mejri, N., Rutti, B., Brossard, M., 2002. Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. *Parasitology Research* 88, 192-197.
- Merino, F.J., Nebreda, T., Serrano, J.L., Fernández-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez, R., 2005. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiology and Infection* 133, 943-949.
- Michalik, J., Hofman, T., Buczek, A., Skoracki, M., Sikora, B., 2003. *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznań. *International Journal of Medical Entomology* 40, 690-697.
- Michalik, J., Skotarczak, B., Skoracki, M., Wodecka, B., Sikora, B., Hofman, T., Rymaszewska, A., Sawczuk, M., 2005. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland. *International Journal of Medical Entomology* 42, 850-856.
- Michel, H., Wilske, B., Hettche, G., Göttner, G., Heimerl, C., Reischl, U., Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., 2003. An ospA-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. *Medical Microbiology and Immunology* 193, 219-226.
- Milhano, N., Carvalho, I.L. de, Alves, A.S., Arroube, S., Soares, J., Rodriguez, P., Carolino, M., Nuncio, M.S., Piesman, J., de Sousa, R., 2010. Coinfections of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia helvetica* with *Borrelia lusitaniae* in ticks collected in a Safari Park, Portugal. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 1, 172-177.
- Milutinović, M., Masuzawa, T., Tomanović, S., Radulović, Z., Fukui, T., Okamoto, Y., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Experimental and Applied Acarology* 45, 171-183.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., Fauci, A.S., 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430, 242-249.
- Movila, A., Reye, A.L., Dubinina, H.V., Tolstenkov, O.O., Toderas, I., Hübschen, J.M., Muller, C.P., Alekseev, A.N., 2011. Detection of *Babesia* sp. EU1 and members of spotted fever group rickettsiae in ticks collected from migratory birds at Curonian Spit, North-Western Russia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 89-91.

- Mrohs, J., 2011. Untersuchung zum Vorkommen und der Verteilung von Flöhen auf Igel. Bachelorarbeit, KIT (Karlsruher Institut für Technologie), Karlsruhe.
- Nakao, M., Miyamoto, K., 1995. Mixed infection of different *Borrelia* species among *Apodemus speciosus* mice in Hokkaido, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 490-492.
- Neumeier, M., 2001. Wurfgrößen und Wurfzeiten in Deutschland, in: 2. Fachtagung "Rund um den Igel", Münster/Westf., 26. und 27. Mai 2001. *Pro Igel*, Neumünster, S. 61-85.
- Nieto, N.C., Foley, J.E., 2008. Evaluation of squirrels (Rodentia: Sciuridae) as ecologically significant hosts for *Anaplasma phagocytophilum* in California. *International Journal of Medical Entomology* 45, 763-769.
- Nieto, N.C., Foley, J.E., Bettaso, J., Lane, R.S., 2009. Reptile infection with *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of granulocytic anaplasmosis. *Journal of Parasitology* 95, 1165-1170.
- Nieto, N.C., Leonhard, S., Foley, J.E., Lane, R.S., 2010. Coinfection of western gray squirrel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Anaplasma phagocytophilum* in California. *Journal of Wildlife Diseases* 46, 291-296.
- Nijhof, A.M., Bodaan, C., Postigo, M., Nieuwenhuijs, H., Opsteegh, M., Franssen, L., Jebbink, F., Jongejan, F., 2007. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7, 585-595.
- Nilsson, K., 2009. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *Journal of Infection* 58, 79-82.
- Nilsson, K., Elfving, K., Pahlson, C., 2010. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden, 2006. *Emerging Infectious Diseases* 16, 490-492.
- Nosek, J., Grulich, I., 1967. The relationship between the tick-borne encephalitis virus and the ticks and mammals of the Tribec mountain range. *Bulletin of the World Health Organization* 36 Supplementum 1, 31-47.
- Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., Kimmig, P., 2002. Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *International Journal of Medical Microbiology* 291, Supplementum 33, 22-29.
- Ogawa, M., Ono, T., 2008. Epidemiological characteristics of tsutsugamushi disease in Oita Prefecture, Japan: yearly and monthly occurrences of its infections and serotypes of its causative agent, *Orientia tsutsugamushi*, during 1984-2005. *Microbiology and Immunology* 52, 135-143.
- Ogden, N.H., Cripps, P., Davison, C.C., Owen, G., Parry, J.M., Timms, B.J., Forbes, A.B., 2000. The ixodid tick species attaching to domestic dogs and cats in Great Britain and Ireland. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 332-338.

- Ogden, N.H., Casey, A.N.J., Woldehiwet, Z., French, N.P., 2003. Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and post-acute phases of infection. *Infection and Immunity* 71, 2071-2078.
- Ohnishi, J., Piesman, J., de Silva, A.M., 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 670-675.
- Oliver, J.H., 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics* 20, 397-430.
- Ostfeld, R.S., Canham, C.D., Oggenfuss, K., Winchcombe, R.J., Keesing, F., 2006. Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. *Public Library of Science Biology* 4, 1058-1068.
- Padula, S.J., Dias, F., Sampieri, A., Craven, R.B., Ryan, R.W., 1994. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1733-1738.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 719-756.
- Pawelczyk, A., Sinski, E., 2000. Prevalence of IgG antibodies response to *Borrelia burgdorferi* s.l. in populations of wild rodents from Mazury lakes district region of Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 7, 79-83.
- Pérez-Osorio, C.E., Zavala-Velázquez, J.E., León, J.J.A., Zavala-Castro, J.E., 2008. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1019-1023.
- Perkins, S.E., Cattadori, I.M., Tagliapietra, V., Rizzoli, A.P., Hudson, P.J., 2006. Localized deer absence leads to tick amplification. *Ecology* 87, 1981-1986.
- Perret, J.-L., Guigoz, E., Rais, O., Gern, L., 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitology Research* 86, 554-557.
- Perseke, L., 2010. Untersuchungen zu Rickettsien am Europäischen Igel (*Erinaceus europaeus*) und seinen Zecken (*Ixodes ricinus* und *Ixodes hexagonus*). Diplomarbeit, KIT (Karlsruher Institut für Technologie), Karlsruhe.
- Petney, T.N., Hassler, D., Brückner, M., Maiwald, M., 1996. Comparison of urinary bladder and ear biopsy samples for determining prevalence of *Borrelia burgdorferi* in rodents in Central Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1310-1312.
- Petney, T.N., Pfäffle, M., Skuballa, J., 2011. An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. *Systematic and Applied Acarology* (in press).
- Petrovec, M., Bidovec, A., Sumner, J.W., Nicholson, W.L., Childs, J.E., Avsic-Zupanc, T., 2002. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wiener Klinische Wochenschrift* 114, 641-647.

- Pfäffle, M., Petney, T., Elgas, M., Skuballa, J., Taraschewski, H., 2009. Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Parasitology* 136, 443–452.
- Pfäffle, M.P., 2010. Influence of parasites on fitness parameters of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Dissertation, KIT (Karlsruher Institut für Technologie), Karlsruhe.
- Pfäffle, M., Petney, T., Skuballa, J., Taraschewski, H., 2011. Comparative population dynamics of a generalist (*Ixodes ricinus*) and specialist tick (*I. hexagonus*) species from European hedgehogs. *Experimental and Applied Acarology* 1–14.
- Plokarz, A., 2010. The role of bird migration in the spatial transfer to ticks and tick-borne diseases. Diplomarbeit, KIT (Karlsruher Institut für Technologie), Karlsruhe.
- Pluta, S., Tewald, F., Hartelt, K., Oehme, R., Kimmig, P., Mackenstedt, U., 2009. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 15, 2077–2078.
- 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 and Tick-Borne Diseases* 1, 145–147.
- Poggensee, G., Fingerle, V., Hunfeld, K.-P., Kraiczy, P., Krause, A., Matuschka, F.-R., Richter, D., Simon, M.M., Wallich, R., Hofman, H., Kohn, B., Lierz, M., Linde, A., Schneider, T., Straubinger, R., Stark, K., Süß, J., Talaska, T., Jansen, A., 2008. Lyme-Borreliose: Forschungsbedarf und Forschungsansätze. Ergebnisse eines interdisziplinären Expertentreffens am Robert-Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt* 51, 1329–1339.
- Porcella, S.F., Schwan, T.G., 2001. *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. *Journal of Clinical Investigation* 107, 651–656.
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G., 1998. Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *Journal of Clinical Microbiology* 36, 3497–3504.
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G., 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 263–271.
- Prendergast, B.J., Freeman, D.A., Zucker, I., Nelson, R.J., 2002. Periodic arousal from hibernation is necessary for initiation of immune responses in ground squirrels. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, 1054–1062.
- Probert, W.S., Crawford, M., Cadiz, R.B., LeFebvre, R.B., 1997. Immunization with outer surface protein (Osp) A, but not OspC, provides cross-protection of mice challenged with North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Infectious Diseases* 175, 400–405.

- Radda, A., Hofmann, H., Kunz, C., 1968. Experimentelle Infektion einiger heimischer Säugerarten mit dem Frühsommer-Meningo-Enzephalitis (FSME)-Virus. Zentralblatt für Bakteriologie 208, 100-104.
- Radolf, J.D., Caimano, M.J., 2008. The long strange trip of *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein C. Molecular Microbiology 69, 1-4.
- Randolph, S.E., Gern, L., Nuttall, P.A., 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitology Today 12, 472-479.
- Randolph, S.E., Rogers, D.J., 2000. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 267, 1741-1744.
- Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 10, 694-719.
- Ras, N.M., Lascola, B., Postic, D., Cutler, S.J., Rodhain, F., Baranton, G., Raoult, D., 1996. Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. International Journal of Systematic Bacteriology 46, 859-865.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M., Hartung, T., 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology 40, 36-43.
- Rauter, C., Hartung, T., 2005. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. Applied and Environmental Microbiology 71, 7203-7216.
- Reeve, N., 1994. Hedgehogs. T & AD Poyser, London.
- Reif, K.E., Macaluso, K.R., 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. International Journal of Medical Entomology 46, 723-736.
- Reis, C., Cote, M., Paul, R.E.L., Bonnet, S., 2010. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11, 907-916.
- Reisen, W.K., 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. Annual Review of Entomology 55, 461-483.
- Reye, A.L., Hübschen, J.M., Sausy, A., Muller, C.P., 2010. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. Applied and Environmental Microbiology 76, 2923-2931.
- Riber, A.B., 2006. Habitat use and behaviour of European hedgehog *Erinaceus europaeus* in a Danish rural area. Acta Theriologica 51, 363-371.

- Richter, D., Schlee, D.B., Allgower, R., Matuschka, F.R., 2004 a. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6414-6419.
- Richter, D., Klug, B., Spielman, A., Matuschka, F.-R., 2004 b. Adaptation of diverse Lyme disease spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Infection and Immunity* 72, 2442-2444.
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F.R., Baranton, G., 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 873-881.
- Rijpkema, S.G., Molkenboer, M.J., Schouls, L.M., Jongejan, F., Schellekens, J.F., 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3091-3095.
- Riley, P.Y., Chomel, B.B., 2005. Hedgehog zoonoses. *Emerging Infectious Diseases* 11, 1-5.
- Rosa, P.A., Tilly, K., Stewart, P.E., 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews. Microbiology* 3, 129-143.
- Roux, V., Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50 Pt 4, 1449-1455.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, J.H., 2009 a. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 3875-3880.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H., Jr, 2009 b. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 134-141.
- Rymaszewska, A., Grenda, S., 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Veterinarni Medicina* 53, 573–584.
- Sadziene, A., Barbour, A.G., 1996. Experimental immunization against Lyme borreliosis with recombinant Osp proteins: an overview. *Infection* 24, 195-202.
- Sanogo, Y.O., Parola, P., Shpynov, S., Camicas, J.L., Brouqui, P., Caruso, G., Raoult, D., 2003. Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990, 182-190.
- Saupe, E., 1988. Die Parasitosen des Igels und ihre Behandlung. *Der Praktische Tierarzt* 12, 49–54.
- Schaarschmidt, D., Oehme, R., Kimmig, P., Hesch, R.D., Englisch, S., 2001. Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *European Journal of Epidemiology* 17, 1067-1074.

- Schaarschmidt-Kiener, D., Müller, W., 2007. Labordiagnostische und klinische Aspekte der kaninen Anaplasrose und Ehrlichiose. *Tierärztliche Praxis* 35, 129–136.
- Schaible, U.E., Kramer, M.D., Eichmann, K., Modolell, M., Museteanu, C., Simon, M.M., 1990. Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 3768-3772.
- Schex, S., Dobler, G., Riehm, J., Müller, J., Essbauer, S., 2011. *Rickettsia* spp. in wild small mammals in Lower Bavaria, South-Eastern Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 493-502.
- Schicht-Tinbergen, M., 1989. Der Igel. 2. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Schilling, F., Böttcher, M., Walter, G., 1981. Probleme des Zeckenbefalls bei Nestlingen des Wanderfalken (*Falco peregrinus*). *Journal of Ornithology* 122, 359-367.
- Schlee, D., 2005. Charakterisierung der Lyme-Spirochäte *Borrelia spielmani* sp. nov. und ihre Assoziation mit Gartenschläfern, *Eliomys quercinus*. Dissertation, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Schmitz, J.L., Schell, R.F., Hejka, A.G., England, D.M., 1990. Passive immunization prevents induction of Lyme arthritis in LSH hamsters. *Infection and Immunity* 58, 144-148.
- Schmitz, J.L., Schell, R.F., Lovrich, S.D., Callister, S.M., Coe, J.E., 1991. Characterization of the protective antibody response to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected LSH hamsters. *Infection and Immunity* 59, 1916-1921.
- Schrader, C., Süß, J., 1999. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289, 319-328.
- Schulte-Spechtel, U., Lehnert, G., Liegl, G., Fingerle, V., Heimerl, C., Johnson, B.J.B., Wilske, B., 2003. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 1299-1303.
- Schutzer, S.E., Fraser-Liggett, C.M., Casjens, S.R., Qiu, W.-G., Dunn, J.J., Mongodin, E.F., Luft, B.J., 2011. Whole-genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology* 193, 1018-1020.
- Schwan, T.G., Burgdorfer, W., Schrupf, M.E., Karstens, R.H., 1988. The urinary bladder, a consistent source of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *Journal of Clinical Microbiology* 26, 893-895.
- Schwarz, A., Maier, W.A., Kistemann, T., Kampen, H., 2009. Analysis of the distribution of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) in a nature reserve of western Germany using Geographic Information Systems. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212, 87-96.

Sekeyova, Z., Roux, V., Raoult, D., 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of “gene D”, which encodes an intracytoplasmic protein. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1353-1360.

Sigal, L.H., 2002. Vaccination for Lyme disease: cost-effectiveness versus cost and value. *Arthritis and Rheumatism* 46, 1439-1442.

Silaghi, C., Gilles, J., Höhle, M., Fingerle, V., Just, F.T., Pfister, K., 2008. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 14, 972.

Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfäffle, M., Petney, T., Taraschewski, H., Passos, L., Pfister, K. 2011. The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)—a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and tick-borne diseases* (in press).

Simpson, W.J., Burgdorfer, W., Schrupf, M.E., Karstens, R.H., Schwan, T.G., 1991. Antibody to a 39-kilodalton *Borrelia burgdorferi* antigen (p39) as a marker for infection in experimentally and naturally inoculated animals. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 236-243.

Simser, J.A., Palmer, A.T., Fingerle, V., Wilske, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4559-4566.

Siuda, K., Stanko, M., Piksa, K., Górz, A., 2009. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing bats in Poland and Slovakia. *Wiadomości Parazytologiczne* 55, 39-45.

Sixl, W., Köck, M., Withalm, H., Stünzner, D., 1989. Serological investigations of the hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Styria. 2. Report. *Geografa Medica. Supplementum* 2, 105-108.

Skarphéðinsson, S., Lyholm, B.F., Ljungberg, M., Søgaaard, P., Kolmos, H.J., Nielsen, L.P., 2007. Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 115, 225-230.

Skotarczak, B., 2002. Canine borreliosis-epidemiology and diagnostics. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9, 137-140.

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

Skotarczak, B., 2009. Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 16, 1-8.

Smismans, A., Goossens, V.J., Nulens, E., Bruggeman, C.A., 2006. Comparison of five different immunoassays for the detection of *Borrelia burgdorferi* IgM and IgG antibodies. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 648-655.

- Smith, J.M.B., 1968. Diseases of hedgehogs. *Veterinary Bulletin* 38, 425–430.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., 2006. Molecular survey of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* from blood of dogs in Italy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 515-518.
- Sommer, R.S., 2007. When east met west: the sub - fossil footprints of the west European hedgehog and the northern white - breasted hedgehog during the Late Quaternary in Europe. *Journal of Zoology* 273, 82-89.
- Sonenshine, D.E., 1993. *Biology of ticks*. Volume 2. Oxford University Press.
- Sprong, H., Wielinga, P., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J., 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites and Vectors* 2, 41.
- Sreter, T., Sreter-Lancz, Z., Szell, Z., Kalman, D., 2004. *Anaplasma phagocytophilum*: an emerging tick-borne pathogen in Hungary and Central Eastern Europe. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 98, 401-405.
- Stanek, G., 2005. Durch Zecken übertragbare Krankheitserreger in Mitteleuropa. *Wiener Klinische Wochenschrift* 117, 373-380.
- Stanek, G., Reiter, M., 2011. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection* 17, 487-493.
- Steere, A.C., Malawista, S.E., Snyderman, D.R., Shope, R.E., Andiman, W.A., Ross, M.R., Steele, F.M., 1977. An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis and Rheumatism* 20, 7-17.
- Stefancíková, A., Derdáková, M., Lencáková, D., Ivanová, R., Stanko, M., Cisláková, L., Petko, B., 2008. Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae in rodents. *Folia Microbiologica* 53, 493-499.
- Stevenson, B., El-Hage, N., Hines, M.A., Miller, J.C., Babb, K., 2002. Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infection and Immunity* 70, 491-497.
- Stöbel, K., Schönberg, A., Staak, C., 2002. A new non-species dependent ELISA for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s. l. in zoo animals. *International Journal of Medical Microbiology* 291 Supplementum 33, 88-99.
- Strle, F., Ruzić-Sabljić, E., Cimperman, J., Lotric-Furlan, S., Maraspin, V., 2006. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clinical Infectious Diseases* 43, 704-710.

- Strle, F., Stanek, G., 2009. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis, in: Lipsker, D., Jaulhac, B. (Hrsg.), Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects. Karger-Verlag, Basel, S. 51–110.
- Strube, C., Montenegro, V.M., Epe, C., Eckelt, E., Schnieder, T., 2010. Establishment of a minor groove binder-probe based quantitative real time PCR to detect *Borrelia burgdorferi* sensu lato and differentiation of *Borrelia spielmanii* by ospA-specific conventional PCR. Parasites and Vectors 3:69, 1-10.
- Stuen, S., Engvall, E.O., Artursson, K., 1998. Persistence of *Ehrlichia phagocytophila* infection in lambs in relation to clinical parameters and antibody responses. Veterinary Record 143, 553-555.
- Stuen, S., Djuve, R., Bergström, K., 2001. Persistence of granulocytic *Ehrlichia* infection during wintertime in two sheep flocks in Norway. Acta Veterinaria Scandinavica 42, 347-353.
- Stuen, S., Van De Pol, I., Bergström, K., Schouls, L.M., 2002. Identification of *Anaplasma phagocytophila* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) variants in blood from sheep in Norway. Journal of Clinical Microbiology 40, 3192-3197.
- Stuen, S., Dahl, H., Bergström, K., Moum, T., 2005. Unidirectional suppression of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in infected lambs. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 12, 1448-1450.
- Stuen, S., 2007. *Anaplasma phagocytophilum*- the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Veterinary Research Communications 31, 79-84.
- Süss, J., 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond—the epidemiological situation as of 2007. Euro surveillance 13, 1-8.
- Swanson, S.J., Neitzel, D., Reed, K.D., Belongia, E.A., 2006. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. Clinical Microbiology Reviews 19, 708-727.
- Tälleklint, L., Jaenson, T.G., 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. Journal of Medical Entomology 31, 880-886.
- Tälleklint, L., Jaenson, T.G., 1996. Seasonal variations in density of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs and prevalence of infection with *B. burgdorferi* s.l. in south central Sweden. International Journal of Medical Entomology 33, 592-597.
- Telford, S.R., Dawson, J.E., Katavolos, P., Warner, C.K., Kolbert, C.P., Persing, D.H., 1996. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 6209-6214.
- Theisen, M., Frederiksen, B., Lebech, A.M., Vuust, J., Hansen, K., 1993. Polymorphism in ospC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. Journal of Clinical Microbiology 31, 2570-2576.

- Tijssse-Klasen, E., Jameson, L.J., Fonville, M., Leach, S., Sprong, H., Medlock, J.M., 2011. First detection of spotted fever group *rickettsiae* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the UK. *Epidemiology and Infection* 139, 524-529.
- Tilly, K., Krum, J.G., Bestor, A., Jewett, M.W., Grimm, D., Bueschel, D., Byram, R., Dorward, D., Vanraden, M.J., Stewart, P., Rosa, P., 2006. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infection and Immunity* 74, 3554-3564.
- Tilly, K., Bestor, A., Dulebohn, D.P., Rosa, P.A., 2009. OspC-independent infection and dissemination by host-adapted *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 77, 2672-2682.
- Tomanović, S., Radulović, Z., Masuzawa, T., Milutinović, M., 2010. Coexistence of emerging bacterial pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Serbia. *Parasite* 17, 211-217.
- Toporkova, M.G., Aleshin, S.E., Ozherelkov, S.V., Nadezhdina, M.V., Stephenson, J.R., Timofeev, A.V., 2008. Serum levels of interleukin 6 in recently hospitalized tick-borne encephalitis patients correlate with age, but not with disease outcome. *Clinical and Experimental Immunology* 152, 517-521.
- Toutoungi, L.N., Gern, L., 1993. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Experimental and Applied Acarology* 17, 581-586.
- Toutoungi, L.N., Gern, L., Aeschlimann, A., 1993. Biology of *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus* under laboratory conditions. Part I. Immature stages. *Experimental and Applied Acarology* 17, 655-662.
- Tsao, J.I., Barbour, A.G., Luke, C.J., Fikrig, E., Fish, D., 2001. OspA immunization decreases transmission of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from infected *Peromyscus leucopus* mice to larval *Ixodes scapularis* ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 1, 65-74.
- Tsao, J.I., Wootton, J.T., Bunikis, J., Luna, M.G., Fish, D., Barbour, A.G., 2004. An ecological approach to preventing human infection: vaccinating wild mouse reservoirs intervenes in the Lyme disease cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 18159-18164.
- Tsao, J.I., 2009. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Veterinary Research* 40, 1-42.
- Turk, N., Milas, Z., Margaletic, J., Turk, R., Barbic, L., Konjevic, D., Peric, S., Stritof, Z., Staresina, V., 2007. The role of fat dormouse (*Glis glis* L.) as reservoir host for spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the region of Gorski Kotar, Croatia. *European Journal of Wildlife Research* 54, 117-121.
- Uilenberg, G., Thiaucourt, F., Jongejan, F., 2004. On molecular taxonomy: what is in a name? *Experimental and Applied Acarology* 32, 301-312.
- Vaerman, J.P., Heremans, J.F., 1971. IgA and other immunoglobulins from the European hedgehog. *Journal of Immunology* 107, 201-211.

- Van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., Dankert, J., 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clinical Infectious Diseases* 17, 708-717.
- Van Tongeren, H.A., 1959. Central European encephalitis-its epidemiology and vectors. *Proceedings of the sixth international congresses on tropical medicine and malaria*.
- Vasiliu, V., Herzer, P., Rössler, D., Lehnert, G., Wilske, B., 1998. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *Medical Microbiology and Immunology* 187, 97-102.
- Víchová, B., Majláthová, V., Nováková, M., Straka, M., Pet'ko, B., 2010. First molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European brown bear (*Ursus arctos*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 10, 543-545.
- Visser, M., Rehbein, S., Wiedemann, C., 2001. Species of flea (Siphonaptera) infesting pets and hedgehogs in Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 48, 197-202.
- Vollmer, S.A., Bormane, A., Dinnis, R.E., Seelig, F., Dobson, A.D.M., Aanensen, D.M., James, M.C., Donaghy, M., Randolph, S.E., Feil, E.J., Kurtenbach, K., Margos, G., 2011. Host migration impacts on the phylogeography of Lyme borreliosis spirochaete species in Europe. *Environmental Microbiology* 13, 184-192.
- Von Lackum, K., Miller, J.C., Bykowski, T., Riley, S.P., Woodman, M.E., Brade, V., Kraiczy, P., Stevenson, B., Wallich, R., 2005. *Borrelia burgdorferi* regulates expression of complement regulator-acquiring surface protein 1 during the mammal-tick infection cycle. *Infection and Immunity* 73, 7398-7405.
- Von Loewenich, F.D., Baumgarten, B.U., Schroppel, K., Geissdorfer, W., Rollinghoff, M., Bogdan, C., 2003. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5033-5040.
- Waldenström, J., Lundkvist, A., Falk, K.I., Garpmo, U., Bergström, S., Lindegren, G., Sjöstedt, A., Mejlom, H., Fransson, T., Haemig, P.D., 2007. Migrating birds and tickborne encephalitis virus. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1215-1218.
- Walker, D.H., Dumler, J.S., 1996. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. *Emerging Infectious Diseases* 2, 18-29.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R., 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, 506-513.
- Walter, V.G., 1981. Seasonal dynamics and biology of *Ixodes trianguliceps* Birula, 1985 (Ixodoidea, Ixodidae) in Northern Germany. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 92, 433-440.

- Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J., 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia genomic* groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 926-932.
- Wang, G., van Dam, A.P., Schwartz, I., Dankert, J., 1999 a. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 633-653.
- Wang, G., van Dam, A.P., Dankert, J., 1999 b. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3025-3028.
- Wedincamp, J., Foil, L.D., 2002. Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). *Journal of Vector Ecology* 27, 96-101.
- Weiss, B.L., Kaufman, W.R., 2004. Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5874-5879.
- Welinder-Olsson, C., Kjellin, E., Vaht, K., Jacobsson, S., Wennerås, C., 2010. First case of human "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 1956-1959.
- Wilske, B., Zöller, L., Brade, V., Eiffert, M., Göbel, U.B., Stanek, G., Pfister, H.W., 2000. MIQ 12 Lyme-Borreliose, in: Mauch, H., Lütticken, R., Gatermann, S. (Hrsg.), *Qualitätsstandards in der mikrobiologisch- infektiologischen Diagnostik*. Urban & Fischer.
- Wilske, B., 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 3, 215-227.
- Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49, 13-21.
- Wilson, M.L., 1994. Population ecology of tick vectors: interaction, measurement and analysis, in: Sonenshine, D.E., Mather, T.N. (Hrsg.), *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses*. Oxford University Press, New York, S. 20-44.
- Wölfel, R., Terzioglu, R., Kiessling, J., Wilhelm, S., Essbauer, S., Pfeffer, M., Dobler, G., 2006. *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in Bavaria, Germany. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, 509-511.
- Wójcik-Fatla, A., Szymańska, J., Wdowiak, L., Buczek, A., Dutkiewicz, J., 2009. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 16, 151-158.
- Woldehiwet, Z., 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology* 167, 108-122.

---

Woolhouse, M.E., Dye, C., Etard, J.F., Smith, T., Charlwood, J.D., Garnett, G.P., Hagan, P., Hii, J.L., Ndhlovu, P.D., Quinnell, R.J., Watts, C.H., Chandiwana, S.K., Anderson, R.M., 1997. Heterogeneities in the transmission of infectious agents: implications for the design of control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 338-342.

Zeman, P., Pazdiora, P., Benes, C., 2010. Spatio-temporal variation of tick-borne encephalitis (TBE) incidence in the Czech Republic: Is the current explanation of the disease's rise satisfactory? *Ticks and Tick-Borne Diseases* 1, 129-140.

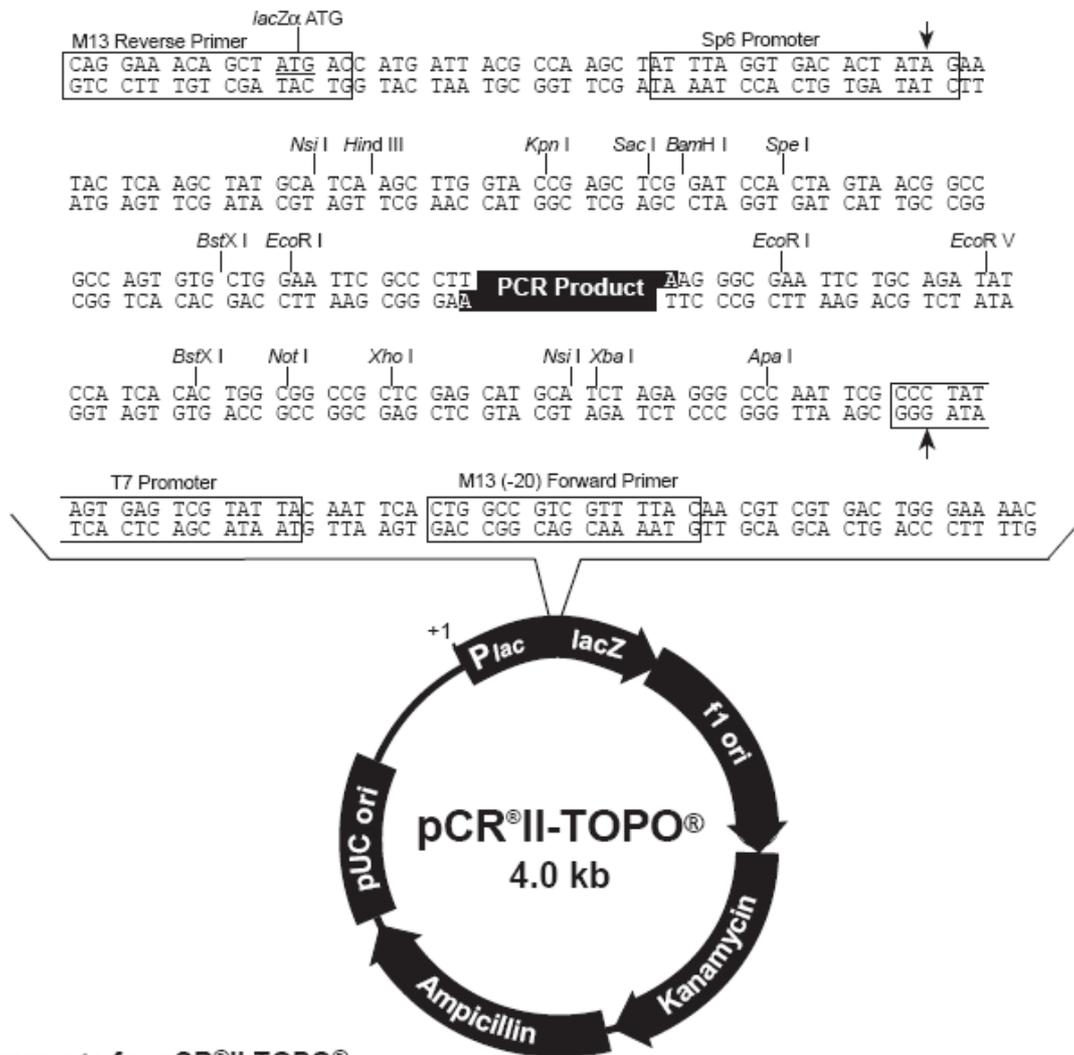
Zhan, L., CAO, W.-C., de Vlas, S., Xie, S.-Y., Zhang, P.-H., Wu, X.M., Dumler, J.S., Yang, H., Richardus, J.H., Habbema, J.D.F., 2008. A newly discovered *Anaplasma phagocytophilum* variant in rodents from southeastern China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8, 369-380.

Zhan, L., Cao, W.-C., Jiang, J.-F., Zhang, X.-A., Wu, X.-M., Zhang, W.-Y., Liu, W., Zuo, S.-Q., Cao, Z.-W., Yang, H., Richardus, J.H., Habbema, J.D., 2010. *Anaplasma phagocytophilum* in livestock and small rodents. *Veterinary Microbiology* 144, 405-408.

Zhioua, E., Rodhain, F., Binet, P., Perez-Eid, C., 1997. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in forestry workers of Ile de France, France. *European Journal of Epidemiology* 13, 959-962.

Zingg, R., 1994. Aktivität sowie Habitat-und Raumnutzung von Igel ( *Erinaceus europaeus* ) in einem ländlichen Siedlungsgebiet. Dissertation, Universität Zürich, Zürich.

## 8 Anhang



Comments for pCR®II-TOPO®  
3973 nucleotides

Abbildung 37: verwendeter Plasmid-Vektor für die Klonierung. Quelle: Invitrogen, Life technologies (<http://products.invitrogen.com>), Datum: 20.02.2010.

Tabelle 28: verwendete Igelseren im Immunblot. Ergebnis nach MiQ-Richtlinie (2-Banden-Kriterium), sowie Ergebnis nach eigener Interpretation mit mindestens einem Punkt in der Wertetabelle (n.a.=not available). GR=Großraum, w=weiblich, m=männlich.

Blot Nummer	Geschlecht	Alter zur Zeit der Blutabnahme	Herkunft	Extinktion Elisa (450 nm)	Bewertung Elisa	Ergebnis (nach MiQ)	Punkte	Ergebnis (mindestens 1 Punkt)
1	w	subadult	GR Frankfurt	1,745	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
2	m	subadult	GR Frankfurt	2,572	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
3	w	adult	GR Frankfurt	0,343	negativ	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
4	m	adult	GR Frankfurt	0,542	negativ	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
5	m	subadult	GR Frankfurt	2,165	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
6	m	subadult	GR Frankfurt	1,583	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
7	w	subadult	GR Frankfurt	0,888	grenzwertig	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
8	w	adult	GR Frankfurt	5,236	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
9	w	subadult	GR Frankfurt	0,692	grenzwertig	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
10	w	subadult	GR Frankfurt	3,031	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
11	w	subadult	GR Frankfurt	1,546	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
12	m	subadult	GR Frankfurt	5,297	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
13	m	adult	GR Frankfurt	5,432	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
14	m	subadult	GR Frankfurt	1,202	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
15	m	subadult	GR Frankfurt	1,363	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
16	m	adult	GR Frankfurt	3,632	positiv	negativ,1Punkt(e)	1	positiv
17	w	adult	GR Frankfurt	1,147	positiv	fraglich,6Punkt(e)	6	positiv
18	w	adult	GR Frankfurt	3,844	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
19	m	subadult	GR Frankfurt	0,791	grenzwertig	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
20	w	subadult	GR Karlsruhe	3,118	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
21	m	subadult	GR Karlsruhe	2,485	positiv	negativ,4Punkt(e)	4	positiv
22	m	subadult	GR Karlsruhe	3,188	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
23	w	adult	GR Karlsruhe	3,932	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
24	m	subadult	GR Hamburg	3,393	positiv	positiv,21Punkt(e)	21	positiv
25	m	adult	GR Hamburg	4,576	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
26	m	adult	GR Hamburg	5,423	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
27	m	subadult	GR Hamburg	3,589	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv

Blot Nummer	Geschlecht	Alter zur Zeit der Blutabnahme	Herkunft	Extinktion Elisa (450 nm)	Bewertung Elisa	Ergebnis (nach MiQ)	Punkte	Ergebnis (mindestens 1 Punkt)
28	w	subadult	GR Hamburg	3,637	positiv	positiv,24Punkt(e)	24	positiv
29	m	subadult	GR Hamburg	3,734	positiv	positiv,24Punkt(e)	24	positiv
30	w	adult	GR Hamburg	3,342	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
31	m	adult	GR Hamburg	3,872	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
32	m	adult	GR Hamburg	3,911	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
33	w	adult	GR Hamburg	3,812	positiv	fraglich,6Punkt(e)	6	positiv
34	w	adult	GR Hamburg	3,963	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
35	w	adult	GR Hamburg	4,014	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
36	w	adult	GR Hamburg	3,878	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
37	m	subadult	GR Hamburg	4,07	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
38	m	adult	GR Hamburg	4,185	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
39	w	adult	GR Hamburg	2,405	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
40	w	adult	GR Hamburg	3,047	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
41	w	subadult	GR Hamburg	4,316	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
42	m	subadult	GR Hamburg	0,435	negativ	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
43	m	adult	GR Hamburg	4,148	positiv	positiv,19Punkt(e)	19	positiv
44	w	adult	GR Hamburg	4,073	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
45	w	adult	GR Hamburg	3,998	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
46	w	subadult	GR Hamburg	4,282	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
47	m	subadult	GR Hamburg	0,931	grenzwertig	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
48	w	adult	GR Hamburg	1,123	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
49	w	adult	GR Hamburg	4,874	positiv	positiv,24Punkt(e)	24	positiv
50	w	adult	GR Hamburg	4,622	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
51	w	adult	GR Hamburg	3,945	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
52	m	adult	GR Hamburg	4,296	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
53	m	adult	GR Hamburg	3,612	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
54	w	juvenil	GR Hamburg	3,476	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
55	w	juvenil	GR Hamburg	2,973	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
56	w	juvenil	GR Hamburg	1,074	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
57	m	juvenil	GR Hamburg	1,632	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
58	w	juvenil	GR Hamburg	3,294	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv

Blot Nummer	Geschlecht	Alter zur Zeit der Blutabnahme	Herkunft	Extinktion Elisa (450 nm)	Bewertung Elisa	Ergebnis (nach MiQ)	Punkte	Ergebnis (mindestens 1 Punkt)
59	m	adult	GR Hamburg	0,895	grenzwertig	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
60	m	subadult	GR Karlsruhe	0,865	grenzwertig	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
61	m	subadult	GR Karlsruhe	3,659	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
62	w	subadult	GR Karlsruhe	1,826	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
63	w	subadult	GR Karlsruhe	2,682	positiv	negativ,1Punkt(e)	1	positiv
64	m	subadult	GR Karlsruhe	3,572	positiv	positiv,14Punkt(e)	14	positiv
65	w	subadult	GR Karlsruhe	1,068	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
66	w	subadult	GR Karlsruhe	2,642	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
67	w	subadult	GR Karlsruhe	0,825	grenzwertig	negativ,1Punkt(e)	1	positiv
68	w	subadult	GR Karlsruhe	3,808	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
69	m	subadult	GR Karlsruhe	3,689	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
70	m	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
71	m	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
72	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
73	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
74	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
75	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
76	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
77	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
78	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
79	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
80	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
81	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
82	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
83	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
84	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
85	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
86	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
87	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
88	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,21Punkt(e)	21	positiv
89	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv

Blot Nummer	Geschlecht	Alter zur Zeit der Blutabnahme	Herkunft	Extinktion Elisa (450 nm)	Bewertung Elisa	Ergebnis (nach MiQ)	Punkte	Ergebnis (mindestens 1 Punkt)
90	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,11Punkt(e)	11	positiv
91	w	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
92	m	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
93	m	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
94	m	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
95	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
96	w	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,0Punkt(e)	0	negativ
97	w	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
98	w	subadult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
99	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	negativ
100	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
101	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
102	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
103	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
104	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,25Punkt(e)	25	positiv
105	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
106	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
107	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv
108	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,15Punkt(e)	15	positiv
109	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
110	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,16Punkt(e)	16	positiv
111	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,21Punkt(e)	21	positiv
112	m	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	negativ,5Punkt(e)	5	positiv
113	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
114	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,10Punkt(e)	10	positiv
115	w	adult	Igelgarten	n.a.	positiv	positiv,20Punkt(e)	20	positiv

Ig	PID	Strip	Antigens	Results
		Reaktivkontr (0) IgM (2) CutOff (3) p100 (4) VlsE (5) p58 (6) p41 (7) p39 (8) OspA (9) OspCBss (10) OspCBaf (11) OspCBga (12) OspCBsp (13) p18Bss (14) p18Baf (15) p18Bg1 (16) p18Bg2 (17) p18Bsp (18)		
IgG	Serum1	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum2	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum3	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum4	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum5	0 1 3 7	*p41(-34,6)	negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum6	0 1 3 8	p39(112,9)	negativ, 5Punkt(e)
IgG	Serum7	0 1 2 3 5	VlsE(6,6)	negativ, 5Punkt(e)
IgG	Serum8	0 1 3 4 5 11 16	p100(429,4); VlsE(400,0); OspCBaf(144,1); p18Bg1(0,0)	positiv, 20Punkt(e)
IgG	Serum9	0 1 3 4 7 16	p100(41,2); p41(329,4); p18Bg1(41,2)	positiv, 11Punkt(e)
IgG	Serum10	0 1 3 4 8	p100(99,5); *p39(-7,9)	negativ, 5Punkt(e)
IgG	Serum11	0 1 3 6 13	p39(111,8); *OspCBsp(-17,6)	negativ, 5Punkt(e)
IgG	Serum12	0 1 3 5	VlsE(925,2)	negativ, 5Punkt(e)
IgG	Serum13	0 1 3 5 8 15 16	VlsE(1238,0); p39(8,9); p18Baf(61,2); p18Bg1(374,9)	positiv, 15Punkt(e)
IgG	Serum14	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum15	0 1 3 4 8	p100(787,3); p39(150,0)	positiv, 10Punkt(e)
IgG	Serum16	0 1 3 7	p41(88,2)	negativ, 1Punkt(e)
IgG	Serum17	0 1 3 4 7 16	*p100(-21,6); p41(127,4); p18Bg1(460,8)	fraglich, 6Punkt(e)
IgG	Serum18	0 1 3 5 8	VlsE(315,7); p39(5,9)	positiv, 10Punkt(e)
IgG	Serum19	0 1 3		negativ, 0Punkt(e)
IgG	Serum20	0 1 3 4 6 8	p100(72,5); *p58(-29,4); p39(131,4)	positiv, 10Punkt(e)

Abbildung 38: Originaldaten Immunblot der Igelseren 1-20. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Ig	PID	Strip	Antigens	Results
		ReactKontr (0) IgM (2) CutOff (3) p100 (4) VlsE (5) p58 (6) p41 (7) p39 (8) OspaA (9) OspCBss (10) OspCBaf (11) OspCBga (12) OspCBsp (13) p18Bss (14) p18Baf (15) p18Bg1 (16) p18Bg2 (17) p18Bsp (18)		
IgG	Serum21		p58(37,3)	negativ,4Punkt(e)
IgG	Serum22			negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum23		p100(537,8); p39(23,8)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum24		p100(246,4); VlsE(154,9); p41(4,6); p39(89,5); OspCBaf(181,0)	positiv,21Punkt(e)
IgG	Serum25		p100(996,3); VlsE(199,5)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum26		p100(28,3); VlsE(1724,0); p39(654,0); OspCBaf(76,5); OspCBga(878,6); OspCBsp(573,8); p18Baf(1306,0); p18Bg1(910,7)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum27		p100(246,7); VlsE(1374,0); p39(48,6); p18Baf(779,3); p18Bg1(729,7)	positiv,20Punkt(e)
IgG	Serum28		p100(2502,0); VlsE(506,3); p58(22,2); p39(592,3); *OspCBaf(-36,7); p18Bg1(420,4)	positiv,24Punkt(e)
IgG	Serum29		p100(495,6); VlsE(260,3); p58(76,5); p39(730,9); p18Bg1(1841,0)	positiv,24Punkt(e)
IgG	Serum30		VlsE(618,3)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum31		p100(1688,0); VlsE(97,6); p39(883,5); p18Baf(224,7); p18Bg1(332,9)	positiv,20Punkt(e)
IgG	Serum32		VlsE(126,6); p18Baf(69,9); p18Bsp(200,6)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum33		p41(390,9); *OspCBaf(-27,0); p18Bg1(5,5)	fraglich,6Punkt(e)
IgG	Serum34		p100(972,4); VlsE(1203,0); p18Baf(655,7); p18Bg1(497,3)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum35		VlsE(1204,0); *p18Baf(-31,4)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum36		p100(866,4); p18Baf(694,1)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum37		VlsE(1171,0); p18Baf(347,0); *p18Bg1(-25,5)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum38		p100(1706,0); VlsE(1156,0); p58(146,7); p41(203,6); p39(742,5); p18Baf(382,0); p18Bg1(955,0); *p18Bsp(-8,9)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum39		p100(69,9); p18Baf(396,7)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum40		p100(900,0); p39(652,9)	positiv,10Punkt(e)

Abbildung 39: Originaldaten Immunblot der Igleseren 21-40. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Ig	PID	Strip	Antigens	Results
		Reactivity Contr (0) Light (2) CutOff (3) p100 (4) VlsE (5) p58 (6) p41 (7) p39 (8) OspA (9) O.spcCBss (10) O.spcCBaf (11) O.spcCBga (12) O.spcCBsp (13) p18Bss (14) p18Baf (15) p18Bg1 (16) p18Bg2 (17) p18Bsp (18)		
IgG	Serum41	LAMP 01 0 1 2 3 4 5 6 7 8 10 12 13 15	VlsE(467,2); *p41(-49,6); p39(51,3); *OspCBss(-41,2); *OspCBga(-3,4); *OspCBsp(-32,8); p18Baf(17,6)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum42	LAMP 02 0 1 2 3		negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum43	LAMP 03 0 1 2 3 4 5 6 8 15 16	*p100(-43,5); VlsE(1509,0); p58(3,5); p39(596,5); p18Baf(1425,0); p18Bg1(558,8)	positiv,19Punkt(e)
IgG	Serum44	LAMP 04 0 1 3 4 5 7 8 11 12 15	p100(646,3); VlsE(484,5); p41(374,3); OspCBaf(815,4); OspCBga(87,5); *p18Baf(-41,2)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum45	LAMP 05 0 1 3 4 5 6 7 8 15	p100(1347,0); VlsE(1131,0); p58(29,4); p41(29,4); p39(366,7); p18Baf(354,9)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum46	LAMP 06 0 1 2 3 4 6 8 15 16 17	*p100(-11,8); *p58(-21,6); p39(507,8); *p18Baf(-11,8); *p18Bg1(-36,3); *p18Bg2(-36,3)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum47	LAMP 07 0 1 3		negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum48	LAMP 08 0 1 3		negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum49	LAMP 09 0 1 3 4 5 6 7 8 15	p100(1847,0); VlsE(1422,0); p58(53,3); *p41(-50,1); p39(830,5); p18Baf(1155,0)	positiv,24Punkt(e)
IgG	Serum50	LAMP 10 0 1 3 4 5 6 7 8 10 11 13	p100(171,8); VlsE(1584,0); p58(13,6); p41(110,9); p39(50,1); *OspCBss(-27,0); OspCBaf(70,4); OspCBsp(127,2)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum51	LAMP 11 0 1 3 5 7 8 16	VlsE(507,0); p41(337,6); p39(1062,0); p18Bg1(83,5)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum52	LAMP 12 0 1 3 4 5 15 16	p100(1414,0); VlsE(484,3); p18Baf(56,9); p18Bg1(496,1)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum53	LAMP 13 0 1 3 4 5 16	*p100(-39,3); VlsE(154,3); p18Bg1(678,0)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum54	LAMP 14 0 1 3 5 6 7 8	VlsE(352,2); *p58(-33,8); p41(116,9); p39(54,4)	positiv,11Punkt(e)
IgG	Serum55	LAMP 15 0 1 3 5 16	VlsE(83,5); p18Bg1(318,8)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum56	LAMP 16 0 1 3		negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum57	LAMP 17 0 1 3 5 8	VlsE(14,1); p39(142,4)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum58	LAMP 18 0 1 3 4 5 6 8 16	p100(1016,0); VlsE(683,0); *p58(-10,8); p39(252,9); p18Bg1(512,6)	positiv,20Punkt(e)
IgG	Serum59	LAMP 19 0 1 3		negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum60	LAMP 20 0 1 3		negativ,0Punkt(e)

Abbildung 40: Originaldaten Immunblot der Igelseren 41-60. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Ig	PID	Strip	Antigens	Results
		Reakt (Kontr) (0) IgG (1) IgM (2) CutOff (3) p100 (4) VlsE (5) p58 (6) p41 (7) p39 (8) OspaA (9) OspCBss (10) OspCBaf (11) OspCBga (12) OspCBsp (13) p18Bss (14) p18Baf (15) p18Bg1 (16) p18Bg2 (17) p18Bsp (18)		
IgG	Serum61		p39(37,3)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum62			negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum63		p41(53,5)	negativ,1Punkt(e)
IgG	Serum64		VlsE(241,7); p58(0,8); p39(409,8)	positiv,14Punkt(e)
IgG	Serum65		VlsE(365,5)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum66		VlsE(160,2)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum67		*VlsE(-41,2); p41(9,8)	negativ,1Punkt(e)
IgG	Serum68		VlsE(146,3); p39(234,6)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum69		p100(124,3); VlsE(256,6); p39(267,6); *p18Baf(-41,2)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum70		*p39(-44,8)	negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum71		p39(450,4)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum72		VlsE(30,3); *p58(-37,0); p39(341,2); *p18Baf(-16,0); p18Bg1(639,5)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum73		VlsE(125,5); p39(272,5); OspCBss(17,6); p18Bg1(743,1)	positiv,20Punkt(e)
IgG	Serum74		VlsE(234,0); p39(154,3); p18Baf(226,4); p18Bg1(609,7)	positiv,15Punkt(e)
IgG	Serum75		VlsE(321,6); *p39(-31,4); p18Bg1(145,1)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum76		VlsE(154,3); p18Bg1(180,8)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum77		VlsE(695,3); p41(412,9); p39(45,9); *p18Baf(-34,1); p18Bg1(540,0)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum78		VlsE(715,1); p41(252,9); p39(47,1); p18Baf(290,8); p18Bg1(542,8)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum79		VlsE(507,0); p41(74,1); *p39(-24,7); p18Baf(309,4); p18Bg1(285,9)	positiv,11Punkt(e)
IgG	Serum80		VlsE(744,0); p41(426,9); *p39(-2,8); p18Baf(534,3); p18Bg1(585,4)	positiv,11Punkt(e)

Abbildung 41: Originaldaten Immunblot der Igelseren 61-80. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Ig	PID	Strip	Antigens	Results
		Reactivkontr (0) Light (2) CutOff (3) p100 (4) VlsE (5) p58 (6) p41 (7) p39 (8) Ospa (9) OspCBss (10) OspCBaf (11) OspCBga (12) OspCBsp (13) p18Bss (14) p18Baf (15) p18Bg1 (16) p18Bg2 (17) p18Bsp (18)		
IgG	Serum81		VlsE(814,0); p41(497,3); p39(8,6); p18Baf(443,0); p18Bg1(379,6)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum82		VlsE(517,6); p41(304,4); p18Bg1(767,6)	positiv,11Punkt(e)
IgG	Serum83		VlsE(418,7); p39(146,0)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum84		p100(672,0); VlsE(826,5); p58(164,7); p41(1029,0); p39(238,2); p18Baf(179,4)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum85		*p39(-2,0); OspCBaf(5,9); *OspCBsp(-41,2)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum86		VlsE(1295,0); p41(463,0); p18Baf(51,3)	positiv,11Punkt(e)
IgG	Serum87		p100(108,1); VlsE(519,9); *p58(-23,1); p39(157,9); OspCBsp(8,6); p18Bg1(121,7)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum88		p100(142,9); VlsE(344,0); *p58(-46,9); p41(150,5); p39(108,7); p18Bg1(537,6)	positiv,21Punkt(e)
IgG	Serum89		p100(154,3); VlsE(1152,0); p58(116,3); p41(461,7); p39(25,2); p18Bss(526,2); p18Bg1(533,8)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum90		VlsE(563,1); p41(290,4); p18Baf(7,0)	positiv,11Punkt(e)
IgG	Serum91		p100(197,8); VlsE(10,3); p39(256,6); p18Bg1(80,1)	positiv,20Punkt(e)
IgG	Serum92			negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum93			negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum94		*VlsE(-33,3)	negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum95		p100(303,4); VlsE(223,5); p39(160,5); OspCBga(47,1); p18Bg1(63,9)	positiv,25Punkt(e)
IgG	Serum96		*VlsE(-52,2)	negativ,0Punkt(e)
IgG	Serum97		VlsE(628,3); *p58(-21,6); p41(68,1); p39(353,8); p18Bg1(264,1)	positiv,16Punkt(e)
IgG	Serum98		VlsE(113,2); p39(72,8); *p18Bg1(-55,9)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum99		VlsE(431,3); *p39(-39,3)	negativ,5Punkt(e)
IgG	Serum100		VlsE(525,0); p18Baf(10,3)	positiv,10Punkt(e)

Abbildung 42: Originaldaten Immunblot der Igleseren 81-100. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Ig	PID	Strip	Antigens																		Results			
			Reaktivkontr (0)	IgM (1)	IgM (2)	CutOff (3)	p100 (4)	VlsE (5)	p58 (6)	p41 (7)	p39 (8)	OspA (9)	OspCBss (10)	OspCBaf (11)	OspCBga (12)	OspCBsp (13)	p18Bss (14)	p18Baf (15)	p18Bg1 (16)	p18Bg2 (17)		p18Bsp (18)		
IgG	Serum101	LAB 01	0	1	+	+	+	+	+	+											p100(328,6); VlsE(311,8); p39(110,1)	positiv,15Punkt(e)		
IgG	Serum102	LAB 02	0	1	2	3	+	+	+	+									16		VlsE(955,1); p18Bg1(425,7)	positiv,10Punkt(e)		
IgG	Serum103	LAB 03	0	1	+	+	+	+	+	+	+	+									*p100(-22,7); VlsE(1006,0); *p58(-46,2); *p39(-9,2); *OspCBaf(-16,0)	negativ,5Punkt(e)		
IgG	Serum104	LAB 04	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+						15	16	p100(634,3); VlsE(1243,0); p58(171,8); p41(13,6); p39(313,8); p18Baf(62,3); p18Bg1(350,3)	positiv,25Punkt(e)		
IgG	Serum105	LAB 05	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+								16	*p100(-16,5); *VlsE(-5,1); *p41(-54,5); p18Bg1(70,8)	negativ,5Punkt(e)		
IgG	Serum106	LAB 06	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+							15	16	p100(173,1); VlsE(1694,0); *p58(-32,8); p39(164,7); p18Baf(316,0); p18Bg1(21,8)	positiv,20Punkt(e)		
IgG	Serum107	LAB 07	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+						15	16	*p100(-50,1); VlsE(1326,0); p58(35,5); p41(559,5); p39(7,0); *OspCBaf(-0,2); p18Baf(131,7); p18Bg1(327,8)	positiv,20Punkt(e)		
IgG	Serum108	LAB 08	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+							15	16	p100(7,8); VlsE(1197,0); *p39(-54,2); p18Baf(416,3); *p18Bg1(-47,7)	positiv,15Punkt(e)		
IgG	Serum109	LAB 09	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+	+							VlsE(1141,0); p39(33,9); *OspCBaf(-6,7); *OspCBsp(-51,3)	positiv,10Punkt(e)		
IgG	Serum110	LAB 10	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+							15	16	p100(27,2); VlsE(157,6); p41(20,8); p18Baf(24,0); p18Bg1(478,7)	positiv,16Punkt(e)		
IgG	Serum111	LAB 11	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+						13	15	16	*p100(-24,6); VlsE(868,3); *p58(-12,5); p41(497,3); p39(41,8); OspCBsp(29,7); p18Baf(452,0); p18Bg1(105,1)	positiv,21Punkt(e)	
IgG	Serum112	LAB 12	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+									VlsE(640,9); *OspCBsp(-54,9)	negativ,5Punkt(e)	
IgG	Serum113	LAB 13	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+									p100(71,9); VlsE(1143,0); *p41(-57,8); *p39(-54,8)	positiv,10Punkt(e)	
IgG	Serum114	LAB 14	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+							14	15	16	18	p100(564,5); *p39(-33,2); *p18Bss(-26,9); p18Baf(179,8); p18Bg1(144,8); *p18Bsp(-26,9)	positiv,10Punkt(e)
IgG	Serum115	LAB 15	0	1	2	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+								VlsE(126,6); p58(52,5); p41(680,0); *p39(-30,3); OspCBaf(684,3); OspCBga(165,8); OspCBsp(571,0); p18Bsp(405,4)	positiv,20Punkt(e)

Abbildung 43: Originaldaten Immunblot der Igelseren 101-115. Cut-Off (CO) Toleranz: -15 %. Rot markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens stärker als CO-Wert ausgeprägt, grün markiert: Reaktivität des jeweiligen Antigens schwächer als CO-Wert ausgeprägt. Stärke der Reaktivitäten des jeweiligen Antigens in Klammern.

Tabelle 29: Übersicht aller untersuchten Sektionsigel. Lf Sek ID=laufende Sektionsnummer, Nr. (P)=verwendete Nummer in Perseke (2010), n.a. not available=nicht verfügbar. Herkunft: ORG=Oberrhein-Gebiet, HH=Hamburg, B=Berlin, LOT=Lottstetten, IG=„Igelgarten“, HO=Hooksiel, UK=Großbritannien, FR=Frankfurt, MÜ=München, AU=Österreich, T=Türkei, CZ=Tschechien.

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
1	1	4	subadult	w	604	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	5	Frühling	2006	ORG	430
2	2		subadult	m	601	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	1	Winter	2005	HH	0
3	3		subadult	m	634	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	2	Winter	2005	HH	0
4	4		subadult	m	306	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	2	Winter	2005	HH	0
5	5		adult	m	662	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	7	Sommer	2005	ORG	0
6	6		subadult	m	576	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	B	10
7	7	13	adult	w	648	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	B	38
8	8		subadult	w	242	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	3	Frühling	2005	HH	0
9	9		adult	w	634	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	6	Sommer	2006	IG	18
10	10		adult	m	575	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	IG	6
11	11		adult	w	673	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	IG	1
12	12		adult	m	952	<i>europaeus</i>	n.a.	<b>positiv</b>	1	Winter	2006	IG	33
13	13		adult	w	722	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	4	Frühling	2006	B	27
14	14		subadult	m	367	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	B	9
15	15		subadult	w	487	<i>europaeus</i>	n.a.	negativ	5	Frühling	2006	B	399
16	17		subadult	m	473	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	HH	0
17	18		subadult	w	568	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	B	206
18	19	9	adult	m	692	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2006	ORG	13
19	20		adult	w	602	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	HH	0
20	21		subadult	w	307	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	IG	0
21	23		subadult	m	426	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	IG	25
22	24		subadult	w	540	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	7	Sommer	2006	IG	5
23	25		adult	w	763	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	IG	86
24	26	26	adult	m	939	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	B	40
25	27	20	adult	w	790	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	B	17
26	28		adult	m	796	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2006	B	18
27	29		subadult	m	650	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	B	3
28	30		adult	m	1.244	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	B	32

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
29	31	32	adult	m	875	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	HH	32
30	32		adult	w	570	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	8	Sommer	2006	IG	10
31	33		adult	w	653	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	8	Sommer	2006	IG	51
32	34	21	subadult	m	379	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	5	Frühling	2006	B	55
33	35		subadult	w	311	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	5	Frühling	2006	B	359
34	36		adult	w	481	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	7	Sommer	2006	HH	213
35	37		adult	m	493	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2005	HH	0
36	39		adult	m	1.045	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2005	ORG	5
37	40		adult	w	1.452	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	B	230
38	41	10	subadult	m	465	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	6	Sommer	2006	ORG	14
39	42	11	adult	m	1.346	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	ORG	8
40	43	12	adult	m	1.015	<i>europaeus</i>	negativ	negativ		n.a.	2006	ORG	2
41	44		adult	m	1.064	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	B	0
42	45		adult	w	706	<i>europaeus</i>	negativ	negativ		n.a.	2006	HH	0
43	46		adult	m	604	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	IG	6
44	47		adult	w	840	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	8	Sommer	2006	B	9
45	48		subadult	m	329	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2006	B	117
46	49		subadult	w	590	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	7	Sommer	2006	IG	37
47	50	33	adult	w	755	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	7	Sommer	2006	B	44
48	51		adult	m	949	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	B	200
49	52		adult	w	784	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	2	Winter	2006	IG	1
50	53		subadult	m	941	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2006	IG	195
51	54	18	adult	m	913	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2006	ORG	22
52	55	27	adult	m	899	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	UK	90
53	56	30	subadult	m	560	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	UK	5
54	57		subadult	w	320	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	UK	131
55	58	31	subadult	w	534	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	UK	97
56	59		subadult	m	585	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	UK	0
57	60	1	subadult	m	523	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	UK	109
58	61		subadult	w	480	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	UK	1
59	62		adult	m	984	<i>europaeus</i>	negativ	negativ		n.a.	2006	UK	2
60	63		adult	w	985	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	UK	0
61	64	16	subadult	m	339	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2006	UK	8

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
62	65		subadult	w	332	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	UK	0
63	66		adult	m	772	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	UK	0
64	67	17	adult	w	963	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	1	Winter	2006	UK	2
65	68		adult	m	1.032	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2005	AU	18
66	69		juvenil	w	159	<i>roumanicus</i>	negativ	<b>positiv</b>	10	Herbst	2005	AU	57
67	70		juvenil	m	293	<i>roumanicus</i>	negativ	<b>positiv</b>	10	Herbst	2005	AU	29
68	71		adult	m	1.041	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	IG	251
69	72		juvenil	w	229	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2005	AU	5
70	73	19	adult	w	935	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2006	ORG	3
71	74		adult	w	666	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2006	ORG	0
72	77		juvenil	w	366	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	UK	0
73	78		juvenil	w	286	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2006	UK	0
74	79	22	juvenil	m	179	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	UK	14
75	80		adult	m	456	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	ORG	0
76	81		adult	m	582	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	IG	18
77	82		adult	m	555	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2006	IG	64
78	83		adult	m	435	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	IG	0
79	84		adult	w	862	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	ORG	31
80	85	23	adult	m	653	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	ORG	36
81	86		adult	m	523	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2005	HH	26
82	87		adult	m	579	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2006	IG	0
83	88		adult	m	675	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	ORG	24
84	89		subadult	w	450	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	HH	0
85	90		subadult	w	241	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	2	Winter	2005	IG	0
86	92		juvenil	w	79	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2006	HH	0
87	94	24	juvenil	w	278	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	HO	2
88	95	25	juvenil	w	101	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	HO	37
89	96		juvenil	w	137	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	HO	0
90	97		juvenil	w	80	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	HO	0
91	101		juvenil	w	148	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	38
92	102		juvenil	m	205	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
93	103		juvenil	m	358	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
94	104		adult	m	800	<i>concolor</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	T	0

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
95	106		juvenil	m	272	<i>concolor</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	T	0
96	107		juvenil	m	286	<i>concolor</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2006	T	0
97	108		juvenil	m	250	<i>concolor</i>	<b>positiv</b>	negativ	n.a.	n.a.	2006	T	0
98	109		adult	w	940	<i>concolor</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	T	0
99	110		juvenil	m	292	<i>concolor</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2006	T	0
100	111		juvenil	m	334	<i>concolor</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	T	0
101	112		adult	w	740	<i>concolor</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	T	0
102	113		adult	w	950	<i>concolor</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2006	T	0
103	114		juvenil	w	296	<i>concolor</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	T	0
104	169		adult	m	715	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2007	HH	0
105	170		adult	w	799	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	FR	0
106	171		juvenil	m	453	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	12	Winter	2006	FR	30
107	172		adult	m	682	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2007	FR	1
108	173		juvenil	w	315	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	FR	14
109	174		juvenil	w	302	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	FR	3
110	175		subadult	w	407	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2007	HO	0
111	176		juvenil	m	291	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	FR	6
112	177		adult	m	959	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2007	HO	0
113	179		adult	m	615	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	1	Winter	2007	IG	2
114	180		juvenil	m	384	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2007	FR	0
115	181		adult	w	775	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	IG	1
116	182		subadult	w	368	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	HH	0
117	183		subadult	w	342	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	HH	11
118	184		adult	w	464	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	HH	0
119	185		subadult	m	360	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	HH	0
120	186		adult	m	993	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2007	ORG	155
121	187		adult	w	465	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2007	HH	3
122	188		adult	w	665	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	10
123	189		adult	m	796	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	0
124	191		adult	w	498	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	3
125	192		adult	w	660	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	34
126	194		adult	m	1.153	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	IG	0
127	195		adult	m	1.104	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	IG	0

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
128	340		juvenil	m	229	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	FR	0
129	341		subadult	w	698	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	FR	0
130	342		subadult	m	253	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2007	FR	0
131	343		adult	m	592	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	1	Winter	2007	IG	0
132	344		juvenil	m	415	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	FR	0
133	345		adult	w	522	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	5	Frühling	2008	ORG	0
134	346		adult	w	1.075	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	6	Sommer	2008	MÜ	17
135	347		adult	w	835	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	MÜ	0
136	350		adult	m	1.005	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	6	Sommer	2008	ORG	0
137	351		adult	w	710	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	MÜ	50
138	352		adult	m	732	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	MÜ	41
139	353		adult	w	480	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	HH	0
140	354		adult	w	780	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2008	IG	0
141	355		adult	m	525	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2008	HH	0
142	356		adult	m	595	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	10	Herbst	2007	HH	0
143	357		adult	w	770	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	HH	0
144	358		adult	w	530	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	3	Frühling	2008	IG	61
145	359		adult	w	530	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	IG	0
146	360		adult	w	705	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	5	Frühling	2008	IG	10
147	361		adult	w	585	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	2
148	362		adult	w	835	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	106
149	363		adult	m	665	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	IG	226
150	364		adult	w	520	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	IG	31
151	365		adult	m	670	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2008	HH	0
152	366		adult	w	720	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	IG	32
153	368		juvenil	m	615	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	11	Herbst	2006	FR	0
154	369		adult	w	700	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	11	Herbst	2006	FR	0
155	370		adult	w	500	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	IG	6
156	371		adult	w	635	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	19
157	372		adult	w	495	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	79
158	373		adult	m	875	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	0
159	374		adult	m	725	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	23
160	375		adult	m	640	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	31

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
161	376		adult	m	580	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	MÜ	486
162	378		subadult	w	n.a.	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	ORG	0
163	377		adult	m	880	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	15
164	420		adult	w	705	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	44
165	421		adult	m	710	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	14
166	422		adult	w	610	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	502
167	423		adult	m	1.000	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	21
168	424		adult	w	600	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	33
169	425		subadult	w	425	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	5	Frühling	2008	ORG	26
170	426		adult	m	800	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	7	Sommer	2008	ORG	251
171	427		adult	w	620	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	ORG	0
172	428		juvenil	w	125	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	ORG	0
173	429		juvenil	w	70	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	ORG	0
174	430		juvenil	m	275	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	MÜ	2
175	431		juvenil	w	240	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	MÜ	3
176	432		juvenil	m	200	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	MÜ	0
177	433		adult	w	880	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	MÜ	2
178	434		adult	m	589	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	3
179	435		adult	w	635	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	1
180	436		juvenil	m	456	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	MÜ	15
181	437		adult	m	709	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	MÜ	0
182	438		adult	w	705	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	MÜ	415
183	439		adult	m	836	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	10	Herbst	2008	IG	2
184	440		adult	w	694	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2008	IG	5
185	441		adult	m	1.110	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	IG	28
186	442		subadult	w	595	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	2	Frühling	2008	HH	0
187	443		juvenil	m	124	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2007	HH	0
188	444		juvenil	m	435	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	HH	0
189	445		adult	m	856	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	IG	0
190	446		adult	m	1.360	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2008	HH	0
191	447		adult	m	723	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	8	Sommer	2008	HH	0
192	448		adult	w	434	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	IG	10
193	449		adult	w	756	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	IG	0

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
194	450		adult	m	688	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	IG	0
195	451		adult	m	675	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2008	IG	0
196	452		adult	m	779	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2008	IG	1
197	453		adult	w	516	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2008	HH	0
198	454		adult	m	1.290	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	HH	0
199	455		adult	w	479	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	FR	128
200	456		adult	w	632	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2007	FR	0
201	457		adult	w	558	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	HH	0
202	458		adult	m	981	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	7	Sommer	2007	HH	0
203	459		adult	m	655	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	FR	0
204	460		adult	w	492	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	HH	0
205	461		adult	w	511	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	HH	0
206	462		juvenil	m	161	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	FR	0
207	463		juvenil	w	90	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	FR	0
208	464		juvenil	w	88	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	0
209	465		adult	m	1.005	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	HH	16
210	466		adult	m	551	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	87
211	467		adult	w	548	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	13
212	468		juvenil	w	197	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2007	FR	3
213	469		adult	w	553	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	13
214	470		juvenil	w	176	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2007	FR	0
215	471		juvenil	w	142	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	9	Herbst	2007	FR	4
216	472		juvenil	m	62	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	HH	0
217	473		adult	w	610	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2007	FR	0
218	474		juvenil	w	276	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	12	Winter	2006	UK	0
219	475		juvenil	m	204	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	UK	0
220	476		adult	w	691	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2007	FR	0
221	477		adult	w	1.158	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2007	FR	0
222	478		adult	w	539	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2007	FR	6
223	479		adult	m	701	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2007	FR	145
224	480		adult	m	542	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	8	Sommer	2007	FR	15
225	481		adult	m	604	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	8	Sommer	2007	FR	24
226	484		adult	w	709	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2007	FR	0

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
227	485		subadult	w	360	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	7	Sommer	2006	LOT	2
228	486		subadult	m	430	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2006	LOT	0
229	487		subadult	m	394	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	3	Frühling	2006	LOT	0
230	488		juvenil	m	475	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	11	Herbst	2006	LOT	2
231	489		juvenil	m	255	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	LOT	0
232	490		adult	w	777	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	LOT	0
233	491		adult	w	957	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	ORG	1
234	492		juvenil	m	250	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	11	Herbst	2006	FR	2
235	493		juvenil	w	544	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
236	494		adult	w	622	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	FR	13
237	495		juvenil	m	304	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
238	496		juvenil	m	236	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	FR	0
239	497		juvenil	w	300	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
240	498		juvenil	m	396	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	11	Herbst	2006	FR	0
241	499		juvenil	m	273	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2006	FR	0
242	500		juvenil	m	424	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	10	Herbst	2006	FR	7
243	501		juvenil	w	258	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	0
244	502		juvenil	w	245	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2006	FR	3
245	504		juvenil	w	475	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	HH	0
246	505		adult	m	1.055	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	HH	0
247	506		adult	w	1.480	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	HH	0
248	507		adult	m	1.070	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	HH	1
249	510		adult	m	715	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	4	Frühling	2008	IG	0
250	CZ1		adult	m	795	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	CZ	32
251	CZ2		subadult	m	260	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	4	Frühling	2008	CZ	0
252	CZ2		juvenil	m	175	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	CZ	0
253	CZ4		juvenil	w	120	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	CZ	4
254	CZ5		subadult	w	265	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	CZ	0
255	CZ6		subadult	w	350	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	4	Frühling	2008	CZ	0
256	CZ7		juvenil	w	260	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	CZ	0
257	CZ8		adult	m	1.035	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	8	Sommer	2008	CZ	7
258	CZ9		juvenil	m	385	<i>europaeus</i>	<b>positiv</b>	negativ	11	Herbst	2008	CZ	1
259	CZ10		juvenil	w	385	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	CZ	3

	Lf Sek ID	Nr.(P)	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Erinaceus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Borrelia</i>	Monat	Jahreszeit	Jahr	Herkunft	Zecken
260	CZ11		juvenil	m	225	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	CZ	0
261	CZ12		juvenil	m	285	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	CZ	0
262	CZ13		juvenil	m	130	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	6	Sommer	2008	CZ	0
263	CZ14		juvenil	w	285	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	11	Herbst	2008	CZ	3
264	CZ15		juvenil	w	130	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	CZ	0
265	CZ16		juvenil	m	245	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	CZ	0
266	CZ17		juvenil	w	205	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	8	Sommer	2008	CZ	0
267	CZ18		juvenil	m	110	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	9	Herbst	2008	CZ	0
268	CZ19		juvenil	m	220	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	CZ	0
269	CZ20		juvenil	m	240	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	CZ	5
270	CZ21		juvenil	m	230	<i>europaeus</i>	negativ	<b>positiv</b>	9	Herbst	2008	CZ	1
271	CZ22		juvenil	w	140	<i>roumanicus</i>	negativ	negativ	10	Herbst	2008	CZ	0
272	UK1		juvenil	m	435	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
273	UK2		juvenil	m	364	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
274	UK3		adult	m	509	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
275	UK4		adult	w	478	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
276	UK5		juvenil	m	316	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
277	UK6		juvenil	m	265	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
278	UK7		adult	m	637	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
279	UK8		adult	m	1.161	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
280	UK9		adult	m	669	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
281	UK10		adult	w	525	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
282	UK11		juvenil	w	251	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
283	UK12		adult	m	873	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
284	UK13		adult	m	598	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0
285	UK14		juvenil	m	405	<i>europaeus</i>	negativ	negativ	n.a.	n.a.	2008	UK	0

Tabelle 30: Übersicht der mit Borrelien infizierten Tiere. W=weiblich, m=männlich, afz=*Borrelia afzelii*, bav=*Borrelia bavariensis*, spiel=*Borrelia spielmanii*, n.a.=not available, nicht verfügbar., unklar=Genospezies nicht zu identifizieren.

LfSekt ID	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Borrelia</i>						<i>Anaplasma</i>
				Organpool (5S23S)	Organpool (OspA)	Mischinfektion	Niere	Herz	Blase	Organpool
1	subadult	w	604	positiv	afzspiel	doppelt	spiel	afz	negativ	<b>positiv</b>
12	adult	m	952	positiv	unklar	einfach	unklar	negativ	negativ	n.a.
24	subadult	w	540	positiv	spiel	einfach	spiel	negativ	negativ	negativ
32	adult	w	570	positiv	unklar	einfach	negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>
34	subadult	m	379	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
35	subadult	w	311	positiv	afzbav	doppelt	negativ	bav	afz	negativ
36	adult	w	481	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
37	adult	m	493	positiv	afz	einfach	afz	negativ	negativ	negativ
41	subadult	m	465	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
49	subadult	w	590	positiv	afzbav	doppelt	afz	bav	afz	negativ
69	juvenil	w	159	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
70	juvenil	m	293	positiv	bav	einfach	negativ	bav	negativ	negativ
171	juvenil	m	453	positiv	bavspiel	doppelt	spiel	bav	spiel	negativ
346	adult	w	1075	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
356	adult	m	595	positiv	bavspiel	doppelt	negativ	negativ	bavspiel	negativ
369	adult	w	700	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
376	adult	m	580	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
378	subadult	w	n.a.	positiv	afzbav	doppelt	bav	afz	afz	negativ
425	subadult	w	425	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
426	adult	m	800	positiv	spiel	einfach	spiel	negativ	negativ	negativ
437	adult	m	709	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	negativ	negativ
447	adult	m	723	positiv	spiel	einfach	negativ	negativ	spiel	<b>positiv</b>
455	adult	w	479	positiv	afzbav	doppelt	bav	bav	afzbav	negativ
480	adult	m	542	positiv	afzbavspiel	dreifach	afz	afz	afzspiel	<b>positiv</b>
481	adult	m	604	positiv	afzspiel	doppelt	spiel	spiel	spiel	negativ
485	subadult	w	360	positiv	bav	einfach	negativ	negativ	negativ	negativ
488	juvenil	m	475	positiv	afz	einfach	afz	afz	afz	negativ
492	juvenil	m	250	positiv	afz	einfach	afz	afz	negativ	negativ

LfSekt ID	Alter	Geschlecht	Gewicht (g)	<i>Borrelia</i>						<i>Anaplasma</i>
				Organpool (5S23S)	Organpool (OspA)	Mischinfektion	Niere	Herz	Blase	Organpool
498	juvenil	m	396	positiv	afzbav	doppelt	afzbav	afz	afzbav	<b>positiv</b>
500	juvenil	m	424	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	<b>positiv</b>
510	adult	m	715	positiv	bav	einfach	negativ	negativ	negativ	negativ
CZ2	juvenil	m	175	positiv	afz	einfach	afz	afz	afz	negativ
CZ15	juvenil	w	130	positiv	afz	einfach	afz	afz	afz	negativ
CZ17	juvenil	w	205	positiv	afzbav	doppelt	afz	afz	bav	negativ
CZ19	juvenil	m	220	positiv	afzbav	doppelt	afz	negativ	bav	negativ
CZ20	juvenil	m	240	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ
CZ21	juvenil	m	230	positiv	afz	einfach	negativ	negativ	afz	negativ

## Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Horst Taraschewski, der mir die Möglichkeit gab, dieses interessante Thema im Rahmen meiner Promotion zu untersuchen und stets zu hilfreichen Diskussionen zur Verfügung stand.

Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Kimmig, Universität Hohenheim, danke ich herzlich für die Übernahme des 1. Korreferates sowie seine stete Hilfsbereitschaft.

Bei Frau Prof. Dr. Doris Wedlich (KIT) möchte ich mich für die kurzfristige Übernahme des 2. Korreferates bedanken.

Großer Dank gilt Herrn Dr. Trevor Petney, der als Mitbetreuer meiner Arbeit stets ein offenes Ohr für mich hatte, und mit Anregungen und Diskussionen zum Gelingen, vor allem im statistischen Bereich, beitrug.

Meinen Mitdoktoranden Dr. Miriam Pfäffle, Dr. Claudia Zetlmeisl, Urszula Weclawski und Alexandra Wenz möchte ich an dieser Stelle für die angenehme und heitere Arbeitsatmosphäre im Institut danken. Miriam Pfäffle danke ich zusätzlich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Igelprojektes. Aber auch den anderen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts, Abteilung Ökologie/Parasitologie, insbesondere Frau Bärbel Seufert-Dausmann, sei an dieser Stelle recht herzlich gedankt.

Herrn Dr. Thomas Bücher gilt mein Dank für die gemeinsame Etablierung des Igelprojekts an der Universität Karlsruhe im Jahr 2004 und für seine vielfältige Unterstützung.

Großer Dank gebührt den Mitarbeitern des Landesgesundheitsamtes Baden-Württemberg, Abteilung Molekularbiologie, insbesondere den technischen Assistentinnen Frau Christine Herrmann und Frau Elke Gutwein für die Einarbeitung in verschiedene molekularbiologische Arbeitsmethoden. Ganz herzlich möchte ich mich in diesem Zuge auch bei Herrn Dr. Rainer Oehme, Frau Dr. Kathrin Hartelt und Frau Dr. Silvia Pluta bedanken, die mich vielfältig im Labor und beim Korrekturlesen, aber auch freundschaftlich unterstützt haben.

Weiterhin danke ich:

- Herrn Dr. Michael Elgas (Klinikum Karlsruhe) für die Unterstützung bei der serologischen Fragestellung und der Hilfe bei der Etablierung des serologischen Testsystems
- Herrn Dr. Gereon Göttner und Herrn Dr. Roland Hofweber (Firma Mikrogen) für die Kooperation und die Auswertung des Immunblots
- Herrn Dr. Hans Dautel (Firma InsectServices) für die Bereitstellung der adulten Zecken für die experimentelle Infektion
- Frau Prof. Dr. Lise Gern (Universität Neuchâtel) für die Bereitstellung der unifizierten Larven
- Herrn Dr. Daniel Schaarschmidt-Kiener (DSL-Labor, Eriskirch) für die Bereitstellung der *Anaplasma*-Sonden

- der Arbeitsgruppe des Instituts für Mikrobiologie der Bundeswehr München (Herrn Dr. Gerhard Dobler und Frau Dr. Sandra Essbauer) für die Kooperation im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Lea Perseke und die Bereitstellung der DNA-Extrakte von Zecken
- Herrn Prof. Dr. Mark Blaxter (University of Edingburgh) für die Möglichkeit, in seinem Labor die Klonierung durchzuführen und meinem Mitdoktoranden Herrn Emanuel Heitlinger, der mir den Aufenthalt dort ermöglichte.
- Herrn Dr. Volker Fingerle (Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, LGL Oberschleißheim) für die OspA-RFLP-Analyse einiger Zecken und Igelisolate.
- der Arbeitsgruppe des Lehrstuhls für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München (Frau Dr. Cornelia Silaghi) für die Zusammenarbeit hinsichtlich der *Anaplasma*-Untersuchung.

Finanziell möchte ich mich bei der Landesgraduiertenförderung Baden-Württemberg und der Grimminger-Stiftung für Zoonosenstiftung für meine persönliche Förderung sehr herzlich bedanken. An dieser Stelle seien auch der Deutsche Akademische Austauschdienst und die Deutsche Gesellschaft für Parasitologie dankend erwähnt, die mir mit Reisekostenzuschüssen den Aufenthalt in Neuseeland bzw. Südafrika ermöglichten.

Besonderer Dank gebührt allen Igel Freunden aus Deutschland und Europa, insbesondere Frau Sigrun und Herrn Heiko Goroncy (Komitee für Igelschutz Hamburg), Frau Elisabeth Swoboda (Verein der Igel Freunde Stuttgart), Frau Ulrike Pachzelt (Igelinsel Mühlheim), Frau Dora Lambert (Arbeitskreis Igelschutz Berlin), Herrn Dr. Wieland Beck (Tierrettung München), Frau Sieglinde Neugebauer (Jennersdorf, Österreich), Frau Dr. Toni Bunnell (University of Hull), Frau Iris Davison (British hedgehog preservation society), Herrn Dr. Pavel Hulva und Frau Barbora Bolfikova (Charles University, Prag) und vielen anderen mehr, die durch ihre Kooperationsbereitschaft zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials beitrugen.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die nicht namentlich erwähnt sind, aber dennoch zum Gelingen dieser Arbeit in irgendeiner Form beigetragen haben.

Last but not least möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich gewesen wären.

# Curriculum vitae

## Persönliche Angaben

Name Jasmin Desirée Skuballa  
Geburtsdatum 7. Mai 1980  
Geburtsort Karlsruhe  
Familienstand ledig, keine Kinder

## Ausbildung und Studium

07/1999 **Abitur** am Otto-Hahn Gymnasium in Karlsruhe

10/1999 – 12/2005 **Studium der Biologie (Diplom)** an der Universität Karlsruhe (TH)  
Hauptfächer: Zoologie (Ökologie), Genetik  
Nebenfächer: Mikrobiologie, Bioverfahrenstechnik

12/2005 **Diplom-Biologin an der Universität Karlsruhe**  
Titel der Diplomarbeit: „Feld- und Laborstudien zur Parasitofauna des Europäischen Igels (*Erinaceus europaeus*)“ bei Prof. Dr. H. Taraschewski

04/2006 – 10/2011 **Promotion am KIT (Karlsruher Institut für Technologie)**,  
Zoologisches Institut, Abteilung Ökologie/Parasitologie (Prof. Dr. H. Taraschewski, Dr. T. Petney) in Zusammenarbeit mit dem Landesgesundheitsamt in Stuttgart (Prof. Dr. Dr. P. Kimmig, Dr. R. Oehme)

10/2011 **Promotionsprüfung zum Dr. rer. nat. am KIT**  
Titel der Dissertation: „Die Rolle des Europäischen Igels (*Erinaceus europaeus*) in der Epidemiologie zeckenübertragener Krankheiten (*Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. und FSME-Viren)“

## Auslandsaufenthalte während der Promotion

01/2008 - 02/2008 Landcare Research Institute, Lincoln (Südinsel Neuseeland)  
Massey University, Palmerston North (Nordinsel Neuseeland)

01/2009 – 02/2009 Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh (Schottland)

11/2009 Tree of Life Workshop (The Taxonomy and Systematics of Ticks), Stellenbosch University (Südafrika)

## Stipendien und Auszeichnungen

05/2006 – 12/2008 Promotionsstipendium der Landesgraduierten-Förderung BW

06/2009 – 01/2011 Stipendium der Grimminger Stiftung für Zoonosenforschung

01/2008 – 02/2008 Reisestipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienst

11/2009 Reisestipendium der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie

10/2009 1. Vortragspreis („Biogents student awards“) bei der DGMEA-Tagung

**Wissenschaftliche Kongresse und Veranstaltungen**

- 04/2004 Teilnahme am 6. internationalen Treffen der EHRG (European hedgehog research group) in Münster
- 03/2007 Teilnahme am „IX International Jena Symposium on Tick-borne Diseases“ in Jena
- 09/2007 Teilnahme am Kongress für “Vector-Borne Diseases: Impact of Climate Change on Vectors and Rodent Reservoirs” in Berlin
- 03/2008 Teilnahme und Posterbeitrag bei der 23. DGP-Tagung (Deutsche Gesellschaft für Parasitologie) in Hamburg
- 11/2008 Teilnahme und Vortrag beim 7. internationalen Treffen der EHRG (European hedgehog research group) in Wageningen/Holland
- 03/2009 Teilnahme am „X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases“ in Weimar
- 10/2009 Teilnahme und Vortrag an der DGMEA/Bik-F Tagung: „Alien and native vectors-risk for human and animal health“ in Frankfurt am Main
- 11/2009 Teilnahme am “Tree of Life Workshop (The taxonomy and systematics of ticks)”, Stellenbosch University, Stellenbosch/Südafrika
- 03/2010 Teilnahme und Vortrag bei der 24. DGP-Tagung (Deutsche Gesellschaft für Parasitologie) in Düsseldorf

**Wissenschaftliche Publikationen****2011**

Skuballa J, Petney TN, Pfäffle M, Oehme R, Hartelt K, Fingerle V, Kimmig P, Taraschewski H (2011) Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis* and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. Ticks and Tick-borne Diseases (in press).

Petney T, Pfäffle M, Skuballa J (2011) An annotated checklist of the ticks (Acari: Ixodida) of Germany. Systematic & Applied Acarology (in press).

Silaghi C, Skuballa J, Thiel C, Pfäffle M, Petney T, Taraschewski H, Passos L, Pfister K (2011) The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) – a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks and Tick-borne Diseases (in press).

**2010**

Petney T, Pfäffle M, Skuballa J, Taraschewski H (2010) Literaturrecherche zum Thema Zecken und zeckenübertragene Krankheiten in Baden-Württemberg – Stand des Wissens (PTKA, Projektträger Karlsruhe, Karlsruher Institut für Technologie).

Petney, T, Skuballa J, Pfäffle M, Taraschewski H (2010) The role of European starlings (*Sturnus vulgaris*) in the dissemination of ticks and tick-borne pathogens in Germany. Emerging infectious diseases. Systematic & Applied Acarology 15: 31–35.

Skuballa J, Pfäffle M, Petney TN, Taraschewski H (2010) Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its ticks. Vector Borne and Zoonotic Diseases 10:1055-1057.

Skuballa J, Taraschewski H, Petney T, Pfäffle M, Smales L (2010) The avian acanthocephalan *Plagiorhynchus cylindraceus* (Palaeacanthocephala) parasitizing the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in Europe and New Zealand. *Parasitology Research* 106: 431-437.

Smales L, Skuballa J, Taraschewski H, Petney T, Pfäffle M (2010) An immature polymorphid acanthocephalan from a European hedgehog (Erinaceidae) from New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology* 37:185-188.

Pfäffle M, Petney TN, Skuballa J, Taraschewski H (2010) Comparative population dynamics of a generalist (*Ixodes ricinus*) and specialist tick (*I. hexagonus*) species from European hedgehogs. *Experimental and Applied Acarology* 54:151-164.

### **2009**

Pfäffle M, Petney TN, Elgas M, Skuballa J, Taraschewski H (2009) Tick-induced blood loss leads to regenerative anaemia in the European Hedgehog (*Erinaceus Europaeus*). *Parasitology* 13: 443-452.

### **2007**

Skuballa J, Oehme R, Hartelt K, Petney T, Bücher T, Kimmig P, Taraschewski H (2007) European hedgehogs as hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerging Infectious Diseases* 13: 952-953.