

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
der Universität Würzburg

Direktorin: Professor Dr. med. Eva-B. Bröcker

Epidemiologische Untersuchungen zum
Vorkommen der Humanen Granulozytären
Ehrlichiose und Babesiose bei Waldarbeitern aus
Südbayern.

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu
Würzburg

vorgelegt von

Marcia Scheller

aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2004

Referent: Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker

Korreferent: Prof. Dr. med. Hans Wolfgang Kreth

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2006

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Geschichte.....	1
1.1.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	1
1.1.2	Babesiose.....	2
1.2	Klassifikation	2
1.2.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	2
1.2.2	Babesiose.....	5
1.3	Morphologie	7
1.3.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	7
1.3.2	Babesiose.....	10
1.4	Übertragung.....	10
1.4.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	10
1.4.2	Babesiose.....	12
1.5	Epidemiologie.....	14
1.5.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	14
1.5.2	Babesiose.....	17
1.6	Pathologie und Immunpathogenese.....	18
1.6.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	18
1.6.2	Babesiose.....	19
1.7	Diagnostik	20
1.7.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	20
1.7.2	Humane Babesiose	21
1.8	Klinik.....	22
1.8.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	22
1.8.2	Babesiose.....	23
1.9	Therapie.....	24
1.9.1	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.....	24
1.9.2	Babesiose.....	25
2	ZIELSETZUNG	26
3	MATERIAL UND METHODEN.....	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	IFT	28
3.1.2	PCR.....	30

3.2	Methoden	36
3.2.1	IFT	36
3.2.2	Granulozytenseparation.....	39
3.2.3	DNA-Isolierung.....	40
3.2.4	PCR.....	40
4	ERGEBNISSE.....	43
4.1	HGE-IFT	43
4.2	Babesien-IFT	43
4.3	Vergleich	43
4.4	PCR	46
5	DISKUSSION.....	47
5.1	Vergleich mit den Ergebnissen anderer Publikationen.....	47
5.1.1	HGE-IFT.....	47
5.1.2	Babesiose-IFT	53
5.1.3	PCR.....	55
5.2	Wertigkeit der Methoden	56
5.2.4	HGE-IFT.....	57
5.2.5	Babesien-IFT	57
5.2.6	PCR.....	58
6	ZUSAMMENFASSUNG	59
7	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	63
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	83
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	84

1 Einleitung

1.1 Geschichte

1.1.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Ehrlichien sind in der Veterinärmedizin schon seit langem bekannt. Sie galten lange als ausschließlich tierpathogen. Die erste Beschreibung des Zeckenbissfiebers, einer fieberhaften Erkrankung mit Leukozytopenie bei Wiederkäuern nach Zeckenstich, 1932, geht auf Gordon et al. zurück (1). Den ursächlichen Erreger, *Rickettsia phagocytophila*, entdeckte dieselbe Forschergruppe 1940. Im Jahr 1945 wurde *Rickettsia phagocytophila* zu Ehren Paul Ehrlichs in *Ehrlichia (E.) phagocytophila* umbenannt, wie ebenfalls der 1935 von Donatien und Lestoquard in Monozyten von Versuchshunden entdeckte Erreger *Rickettsia canis*. Als erster humanpathogener Erreger wurde 1953 in Japan *E. sennetsu* entdeckt (2), der vor kurzem in *Neorickettsia (N.) sennetsu* umbenannt wurde (127). *N. sennetsu* wird nicht von Zecken, sondern durch Fischparasiten übertragen und wird ausschließlich aus Südostasien gemeldet. Der Erreger verursacht ein Mononukleose-ähnliches Krankheitsbild. In den USA wurde der erste Fall einer Ehrlichieninfektion eines Menschen im Jahr 1986 beschrieben und der Erreger vier Jahre später als *E. chaffeensis*, Prototyp der Humanen Monozytären Ehrlichiose (HME), bezeichnet (3, 4). HME imponiert als unspezifische fieberhafte Erkrankung nach Zeckenstich (*Amblyomma americanum*) und wird hauptsächlich aus dem Süden der USA gemeldet.

Der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose (HGE) wurde 1994 ebenfalls in den USA entdeckt und durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der *E. phagocytophila* Genogruppe zugeordnet (5). HGE, eine fieberhafte Systemerkrankung mit Leukozytopenie, spielt heute eine weit größere Rolle als HME und kommt gemäß molekularbiologischer Analysen bei akut Erkrankten auch in Europa vor. Seitdem sind Ehrlichiosen auch für die Humanmedizin in Europa von Bedeutung. Der Forschergruppe um Goodman gelang 1996 die Isolierung und Anzucht in einer humanen Leukämiezelllinie (HL60) (6).

Erst vor kurzem wurden die Erreger der Humanen Ehrlichiosen neu klassifiziert. Der Erreger der HGE wurde in *Anaplasma phagocytophilum* umbenannt und schließt die vorher als *E. equi* (Erreger der Equinen Granulozytären Ehrlichiose) und *E. phagocytophila* bekannten, tierpathogenen Erreger ein (127).

1.1.2 Babesiose

Babesien waren die ersten Erreger, bei denen die Infektionsübertragung durch Arthropoden auf Vertebraten gezeigt werden konnte. Der Erreger, ursprünglich genannt Pyrosoma, wurde 1893 von Smith und Kilbourne als Erreger des Texas Cattle Fevers entdeckt (7). Die erste Dokumentation einer Infektion des Menschen mit Babesien, im Jahr 1957, bezieht sich auf den Fall eines splenektomierten Landarbeiters aus dem ehemaligen Jugoslawien. Als Erreger wird *Babesia (B.) bovis* genannt. Seit 1957 wurden 31 weitere Fälle von Humaner Babesiose, einer Malaria-ähnlichen fieberhaften Erkrankung nach Zeckenstich, aus Europa gemeldet. 23 (74%) davon gehen auf *B. divergens* zurück. Bei mindestens 26 der 31 Fälle (84%) waren die Patienten splenektomiert (8). Im Jahr 1968 beschrieben Scholtens et al. den ersten Fall einer Humanen Babesiose in den USA (9). Der Erreger, *Babesia microti*, ruft die Erkrankung in nicht splenektomierten Individuen mit unbeeinträchtigtem Immunsystem hervor. Über 300 Fälle wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika dokumentiert. Dort werden auch zunehmend Infektionen durch entfernter verwandte Erreger, wie den neuentdeckten WA1-Typ der Babesien, beschrieben (10).

1.2 Klassifikation

1.2.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Die Mikroorganismen wurden bis vor kurzem als Genus *Ehrlichia* in der Familie der Rickettsiaceae klassifiziert. Diese wurden nach ihrem jeweiligen historischen Prototyp als *E. chaffeensis*, *E. phagocytophila* und *E. sennetsu* Genogruppe bezeichnet.

Vor kurzem wurden die Erreger der Ehrlichiosen, basierend auf Gensequenzen, die 16SrRNA und groESL kodieren, neu klassifiziert und einige der Organismen verschiedenen anderen Genogruppe der Rickettsien – darunter *Anaplasma* und *Neorickettsia* - die nach 16SrRNA-Analysen ebenfalls nahe mit den Ehrlichien verwandt, aber formal in anderen Stämmen und Familien klassifiziert sind, zugeordnet (127). Davor basierten die Taxonomie und Phylogenie der Mitglieder des Genus *Ehrlichia* auf Morphologie, Wirtszellwahl und Serologie. Die molekulare phylogenetische Klassifikation mit Sequenzanalysen durch PCR-Amplifikation der 16SrRNA Untereinheit belegt die serologische Gruppierung der Organismen, spricht aber gegen eine Einteilung, die allein auf der Wirtszellwahl beruht (13). Schon vor der Reklassifizierung häuften sich die Stimmen, die *E. equi* und den Erreger der Humanen

Granulozytären Ehrlichiose für ein und denselben Organismus hielten (5, 11, 12), aber der HGE- Erreger konnte - wegen sehr weitgehender Homologie - keiner eigenen Spezies zugeordnet werden (5, 11). Gemäß der neuen Klassifikation ist der Erreger der Humane Granulozytäre Ehrlichiose, kürzlich umbenannt in *Anaplasma phagocytophilum*, identisch mit den vorher als *E. phagocytophila* und *E. equi* bekannten, tierpathogenen Erregern (127).

Basierend auf Homologien ihrer 16SrRNA-Gensequenzen werden die Erreger nach der neuen Klassifikation in folgende Genogruppen aufgeteilt (127):

1.2.1.1 *E. canis*/Cowdria Genogruppe

Zur *E. canis* Genogruppe gehören neben dem Hundemonozyten und -makrophagen befallenden Pathogen *E. canis*, *E. chaffeensis*, (der Erreger der Humanen Monozytären Ehrlichiose), *E. muris* (Mäusemonozyten) und *E. ewingii* (Hundegranozyten), ein Erreger, der nach Untersuchungen, die auf Buller et al. zurückgehen, auch Menschen infiziert (15). Auch *E. canis* konnte in Venezuela aus dem Blut eines asymptomatischen Mannes isoliert werden (69). Nach einigen Autoren wird gemäß genetischer Analysen auch *Cowdria ruminatum* in derselben Genogruppe beschrieben (127). Alle Erreger sind gemäß 16SrRNA-Gensequenzanalysen zu mindestens 97,7% identisch (127).

1.2.1.2 *E. phagocytophila*/*Anaplasma* Genogruppe

Der historische Prototyp der *E. phagocytophila*/*Anaplasma* Genogruppe - *E. phagocytophila* - ist ein vorwiegend in Europa auftretender Erreger, der in neutrophilen Granulozyten von Wiederkäuern persistiert. Neben dem humanpathogenen Vertreter, dem HGE-Erreger (*Anaplasma phagocytophilum*), finden sich in dieser Genogruppe die mit diesem nach der neuen Klassifikation als identisch anzusehenden Organismen *E. equi*, (Erreger der Equinen Granulozytären Ehrlichiose) und *E. phagocytophila* - die Homologien der 16SrRNA-Sequenzen dieser Erreger sind größer als 99,1% (5) und die Unterschiede reichen nicht aus, um die Erreger als unterschiedliche Spezies zu bezeichnen (127) - sowie *Anaplasma* (ehemals *Ehrlichia*) *platys* (Hundegranozyten) und *Anaplasma* (*Ehrlichia*) *bovis*. Die Erreger gehören nach der neuen Klassifizierung zum Genus *Anaplasma*, da sie zu mindestens 98,2% identisch mit jeder anderen *Anaplasma* Spezies sind (127).

1.2.1.3 E. sennetsu/Neorickettsia Genogruppe

Zur E. sennetsu Genogruppe, kürzlich neu bezeichnet als Neorickettsia Genogruppe, gehört neben Neorickettsia (ehemals Ehrlichia) sennetsu der Erreger Neorickettsia (Ehrlichia) risticii (Erreger des Potomac horse fevers/der Equinen Monozytären Ehrlichiose). Beide Erreger infizieren Zellen des Monozytären Phagozytensystems. Die 16SrRNA Homologie mit den anderen Ehrlichien beträgt nur 82% bis 83,9%. Phylogenetisch ist N. sennetsu somit entfernter mit den anderen Genogruppen verwandt, als es allgemein für ein Genus als angemessen definiert ist (3). Nach molekulargenetischen Analysen gehört auch Neorickettsia helminthoeca, ein Erreger, der Hunde infiziert, die durch Egel infizierten Fisch fressen, in diese Genogruppe (12, 13). Ein weiteres verwandtes Pferdepathogen - das Ohio 081 Isolat (14) - und der SF-Erreger sind ebenfalls in der Neorickettsia Genogruppe klassifiziert. Mit dem SF-Erreger, der aus dem Egel *Stellantchamus falaceus* isoliert wurde, konnte noch keine Krankheit assoziiert werden (16). Alle Erreger haben 94,9% bis 100% identische 16S rRNA Gensequenzen (127).

Einen Überblick über die Verwandtschaftsverhältnisse der Erreger gibt Abbildung 1.

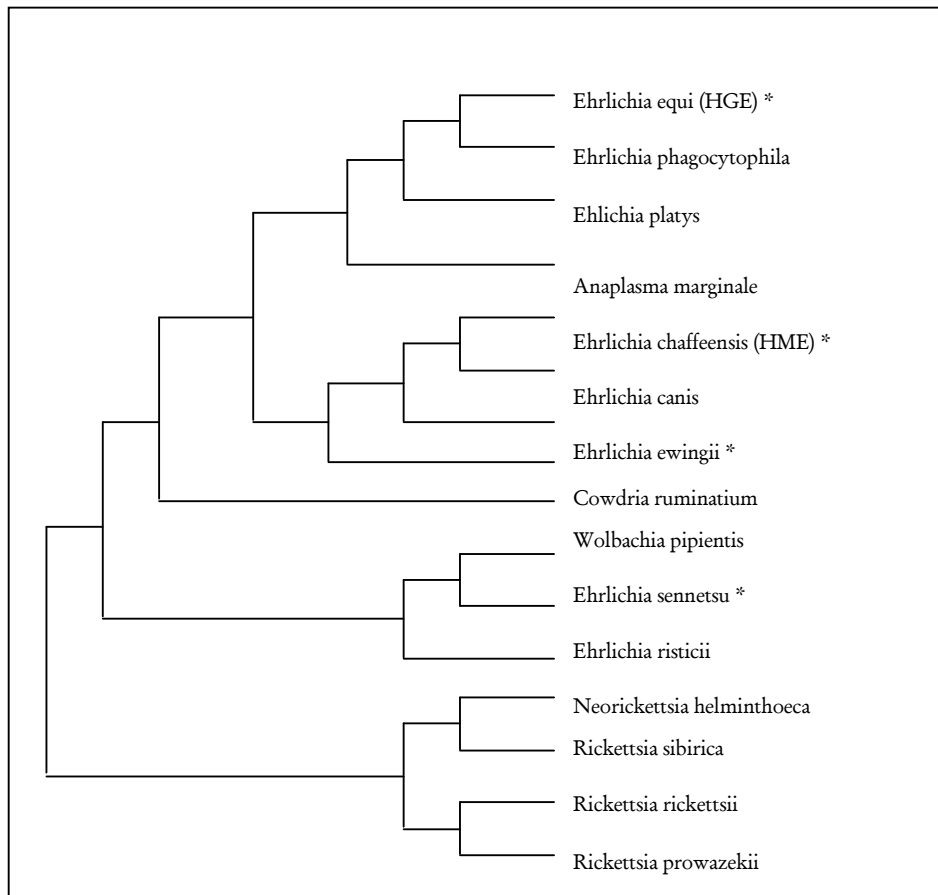


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum anhand von Homologien der 16SrRNA-Sequenzen. Humanpathogene Erreger sind mit einem * markiert.

1.2.2 Babesiose

Babesien sind Protozoen. Die Taxonomische Klassifikation der Babesia Spezies (spp.) platziert diese im Stamm der Apicomplexa (auch Sporozoen genannt), Klasse Aconoidasida (Piroplasma), Unterklasse Piroplasmida, welcher die Genera Plasmodium, Babesia, Toxoplasma und Cryptosporidium enthält (17). Weitere Erreger von veterinärmedizinischem Interesse innerhalb dieser Unterklasse der Piroplasmida sind Theileria und Cytauxzoon. Piroplasmen sind gekennzeichnet durch intraerythrozytäre Erreger, die birnenförmig sein können (17).

Anfänglich wurden die Babesia spp. anhand von morphologischen Parametern ihrer intraerythrozytären Erscheinungsformen im Blutaussstrich (Trophoziten) klassifiziert.

Mehr als 100 Spezies sind auf diese Weise beschrieben worden. Heute nimmt man an, dass es sich bei vielen der Beschreibungen um ähnliche oder identische Spezies handelt, die sich im Blutausschlag unterschiedlicher Wirte verschieden darstellen und mit dieser Methode nicht differenzierbar sind. Anhand der 18S ss-rRNA Gensequenz-Untereinheit kann die Spezies heute durch PCR-Sequenzierung phylogenetisch in Genogruppen aufgeteilt werden. Die morphologische Unterteilung in kleine Babesien (Trophozoiten kleiner als 2,5 µm) und große Babesien (Trophozoiten 2,5 - 5,0 µm) stimmt generell mit der phylogenetischen Klassifizierung überein (18). Eine Ausnahme bildet der Erreger *B. divergens*, der morphologisch den kleinen Babesien (Trophozoiten 0,4- - 1,5 µm) zuzuordnen ist, anhand der nss-rDNA aber - nach der Errechnung des Pileup Programms der Wisconsin Genetics Computer Group - näher mit den großen Babesien verwandt ist (19). Zu den kleinen Babesien zählen *B. gibsoni*, *B. microti* und *B. rodhaini*, zu den großen Babesien *B. bovis*, *B. caballi* und *B. canis*. Den phylogenetischen Stammbaum anhand der 18S ss-rRNA Gensequenz erläutert Abbildung 2.

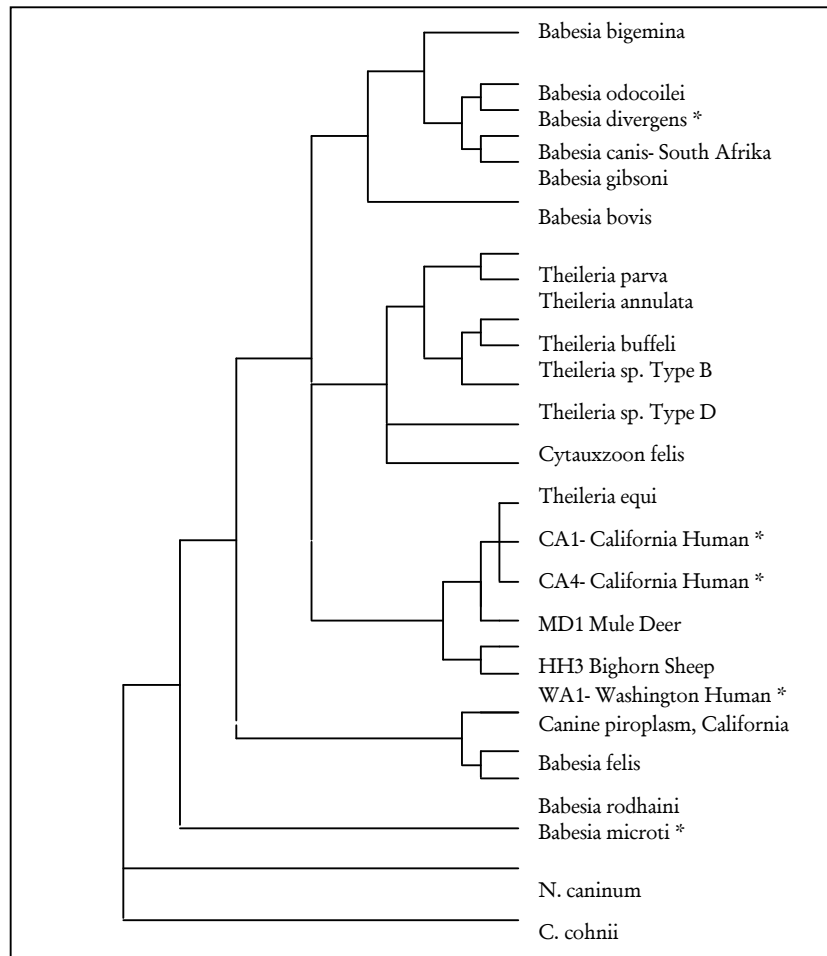


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Piroplasmen anhand 18S ss rRNA Gensequenzanalysen. Humanpathogene Spezies sind mit einem * gekennzeichnet.

1.3 Morphologie

1.3.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Ehrlichien sind an ein obligat intrazelluläres Wachstum in den verschiedenen Leukozytenfraktionen gebunden. Dort vermehren sie sich in intrazellulären Einschlusskörperchen durch Zweiteilung. Die Einschlusskörperchen haben eine Länge von 0,5 μm bis 2,0 μm . In Giemsa-Färbung sind sie lichtmikroskopisch als charakteristische Mikrokolonien mit bis zu 100 Elementarkörperchen in maulbeerartiger Lagerung (Morulae) nachweisbar. Der Durchmesser dieser Morulae beträgt üblicherweise 1,5 – 2,5 μm , sie können aber bis zu 6,0 μm groß sein (13). In einer Wirtszelle können mehrere Morulae vorhanden sein.

Die Möglichkeit der Anzucht der Ehrlichien in Zellkultursystemen (Leukämiezelllinien, HL60) erlaubt detailliertere Studien ihrer Biologie und Ultrastruktur. Den ersten ultrastrukturellen Vergleich der drei Genogruppen führte die Arbeitsgruppe um Popov 1998 durch (13). In elektronenmikroskopischer Darstellung erscheinen die Einzelzellen in den membrangebundenen Kompartimenten entweder groß, rund und retikulär, oder schmal und elektronendicht. Die meisten Morulae enthalten dabei nur retikuläre oder nur elektronendichte Zellen. Von beiden Zelltypen existieren alterierte, abnorme Formen. Die ultrastrukturelle Morphe ist hochvariabel. Beide Strukturen wurden im Stadium der Zweiteilung beobachtet. Die Unterschiede im Aufbau der intravakuolären Mikrokolonien (Morulae) und deren Interaktionen mit der Wirtszelle führte zum Versuch einer Einteilung in Genogruppen (13). Die Morulae der *E. canis* Genogruppe sind groß und enthalten viele Ehrlichien, oft eingebettet in eine fibrilläre Matrix. Die Mitochondrien und das Endoplasmatische Reticulum der Wirtszelle stehen häufig mit der Morulaemembran in engem Kontakt. Im Gegensatz dazu besitzen die Morulae der *E. phagocytophila* Genogruppe keine fibrilläre Matrix, und es besteht kein Kontakt der Morulaemembran zu Organellen der Wirtszelle. Das Hauptkriterium der *E. sennetsu* Genogruppe sind einzelne schmale Vakuolen, die nicht miteinander fusionieren (13).

Ultrastrukturellen Studien gemäß besitzen Ehrlichien einen dreischichtigen, gram-negativen Zellwandaufbau, mit sehr dünner äußerer Membran, in der jedoch weder Lipopolysaccharide (LPS), Lipooligosaccharide (LOS) noch Peptidoglykan (Muramin) vorkommen (20).

Der HGE-Erreger war das erste Pathogen, bei dem man zeigen konnte, dass es spezifisch neutrophile Granulozyten als Wirtszellen auswählt. Bei schwerer Ausprägung der Krankheit können aber wahrscheinlich auch Zellen, die nicht der hämatopoetische Zelllinie angehören, infiziert werden (21, 22). Nach Webster et al. sind die Kompartimente in den Wirtszellen Teil des Endozytoseweges, da die Vakuolen, die die HGE-Erreger beinhalten, endozytotisch Goldpartikel aufnehmen (23). Die Endozytose wird von den HGE-Erregern so modifiziert, dass das Überleben des Pathogens in der Zelle ermöglicht wird. Die Zerstörung durch lysosomale Enzyme wird dadurch verhindert, dass eine Fusion der Vakuole mit den Lysosomen nicht stattfindet. Nach Webster et al. handelt es sich bei den Vakuolen, die die HGE-Erreger enthalten, nicht um

Phagolysosome, da 3-(2,4-Dinitroanilino)3'-Amino-N-Methyldipropylamin, das in Kompartimenten mit niedrigem pH akkumuliert, in den Vakuolen nicht präsent war (23, 24). Die Infektion der Wirtszelle erfolgt im Falle der Humanen Granulozytären Ehrlichiose über einen zellständigen Liganden für Selektine (CD15s), der zu einer Gruppe von Adhäsionsmolekülen gezählt wird. Die Adhäsion von HGE-Erregern an HL60-Zellen korreliert direkt mit ihrer CD15s Expression und es konnte nachgewiesen werden, dass monoklonale Antikörper gegen CD15s fähig sind, eine HGE-Infektion zu verhindern (26). Eine zentrale Rolle für die Fähigkeit von HGE, an neutrophilen Zellen zu binden und sie zu infizieren, spielt der leukozytäre P-Selektin Ligand (PSGL-1). Es konnte gezeigt werden, dass monoklonale Antikörper gegen die P-Selektin Bindungs-Domäne eine HGE-Infektion verhindern können (27). Die Mikrokolonien mit bis zu 100 Elementarkörperchen pro Vakuole bilden sich 7 - 12 Tage nach der Infektion. Die Freisetzung der Elementarkörperchen erfolgt mittels Exozytose oder durch Lyse der Wirtszelle. Die so freiwerdenden Ehrlichien können neue Zellen infizieren. Abbildung 3 stellt den Entwicklungszyklus der Ehrlichien schematisch dar.

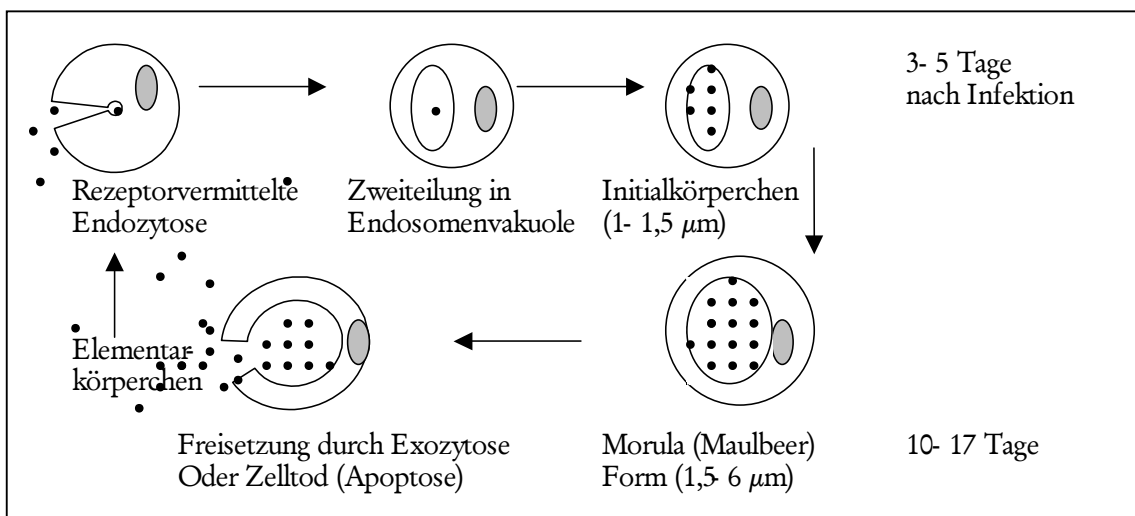


Abbildung 3: Entwicklungszyklus der Ehrlichien.

Der Erreger toleriert Kältebedingungen von 4° C bis zu 18 Tage lang. Deswegen erscheint es sinnvoll, HGE in die Liste der potentiell durch Bluttransfusionen übertragbaren Infektionen aufzunehmen (25).

1.3.2 Babesiose

Babesien halten sich während eines Teiles ihres Lebenszyklus im Inneren der Erythrozyten von Vertebraten auf. Im Fall von *B. microti* sind Parasitämien von 1% - 20% der Erythrozyten bei Patienten mit normaler Milz und Parasitämien von bis zu 80% bei splenektomierten Patienten typisch (28). *B. divergens* befällt 1% - 50% der Erythrozyten (8). In einem Blutausschlag sind die Merozoiten (1 – 3 µm) in Giemsa-Färbung lichtmikroskopisch nachweisbar (29). In Ringform vorliegende Merozoiten zeichnen sich durch dunkle Nuklei in der Peripherie des Ringes und ungefärbte Vakuolen im Zentrum aus. Daneben sind eine Tränenform oder eine piroplasmatische Form möglich. Charakteristisch ist auch eine Tetradenform („Maltese cross“-Form) der Trophozoiten bei deren Vierteilung bei der asexuellen Vermehrung in den Erythrozyten. Diese gilt als diagnostisches Unterscheidungsmerkmal zu Plasmodien. Die Unterscheidung von Babesiose und Malaria im Giemsa-gefärbten Blutausschlag ist schwierig, aber möglich. Bei der Babesiose kommen im Gegensatz zur Malaria keine Pigmentablagerungen, Schizonten und Gametozyten im Blutausschlag vor. Manchmal werden extrazelluläre Merozoiten gefunden. Multiple Infektionen der Erythrozyten sind möglich.

1.4 Übertragung

1.4.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Der Hauptvektor des HGE-Erregers (*Anaplasma phagocytophilum*) in Westeuropa ist *Ixodes ricinus* (30, 31), eine Schildzecke aus der Familie der Ixodidae, die mit 95% die häufigste Zeckenart in Deutschland ist. Außerdem sind die Zeckenarten *Dermacentor* und *Amblyoma* weitere potentielle Vektoren. Nach Levin et al. scheint *Dermacentor variabilis* hingegen kein kompetenter Vektor für HGE zu sein (32). In der USA wird im Nordosten und Westen die Hirschzecke *Ixodes scapularis*, im Westpazifik *Ixodes pacificus*, die Schwarzfußzecke, als Vektor angenommen.

Im Blut von verschiedenen Säugetieren wurden bei seroepidemiologischen Studien Antikörper und HGE-Erreger spezifische DNA gefunden. Das natürliche Reservoir des Erregers ist jedoch noch nicht sicher geklärt. Seit kurzem häufen sich die Stimmen, dass *Peromyscus leucopus*, die Weißfußmaus, und *Odocoileus virginianus*, der Weißschwanzhirsch, die wichtigsten tierischen Reservoirs darstellen (33, 34).

Die Ixodes Zecken durchlaufen drei Stadien (Larve, Nymphe, Adulte). Vor jedem Entwicklungsschritt benötigen sie eine Blutmahlzeit. Die meisten Infektionen scheinen von Nymphen übertragen zu werden, da diese nur etwa 1,5 mm groß sind, und so im Gegensatz zu Adulten (5 mm) leichter übersehen werden (130). Da Ehrlichien nur transstadiell, nicht aber transovariell (Übertragung der Ehrlichien durch die infizierte weibliche Zecke auf ihre Nachkommen) übertragen werden, sind nur Nymphen und adulte Zecken infektiös (35). Es wurde angenommen, dass der Lebenszyklus des Erregers in den Zecken dem der Borrelien sehr ähnelt (36). Inzwischen geht man aber von einem unterschiedlichen Erhaltungszyklus aus (32). Die zeckenübertragenen Pathogene scheinen eine Mindestzeitspanne zur Reaktivierung und Replikation während der Blutmahlzeit zu benötigen, bevor sie zur Infektion fähig sind. Werden die Zecken innerhalb der ersten 36 Stunden entfernt, ist eine Infektion mit HGE eher unwahrscheinlich (38). Durch persistierende klinisch stumme Infektionen mit Ehrlichämie in Wirtssäugetieren können die Erreger auf viele Zecken über einen langen Zeitraum hinweg übertragen werden. Chronisch persistierende Infektionen auch nach Therapie sind eine interessante Besonderheit veterinärmedizinischer Ehrlichiosen.

Der Mensch gilt eher als Nebenwirt für Ixodes-Zecken. Zwei Drittel der an Ehrlichiosen erkrankten Personen geben anamnestisch einen Zeckenstich an (36). Der überwiegende Teil hat sich in ländlichen Gebieten mit Zeckenvorkommen aufgehalten. Die meisten Infektionen ereignen sich zwischen Mai und August, den Monaten mit der höchsten Zeckenaktivität (35). Zeckenstiche gelten uneingeschränkt als wichtigster Risikofaktor einer HGE-Infektion. Darüber hinaus gibt es Berichte über die Möglichkeit einer HGE-Infektion durch infiziertes Blut - es existieren Berichte über Jäger, die sich bei intensivem Kontakt mit Hirschfleisch mit HGE infiziert haben (39) - sowie perinatal (transplazentar oder intrapartal) (37).

Den Lebenszyklus der Ixodes Zecken, hier am Beispiel von *Ixodes scapularis* (*dammini*), zeigt Abbildung 4.

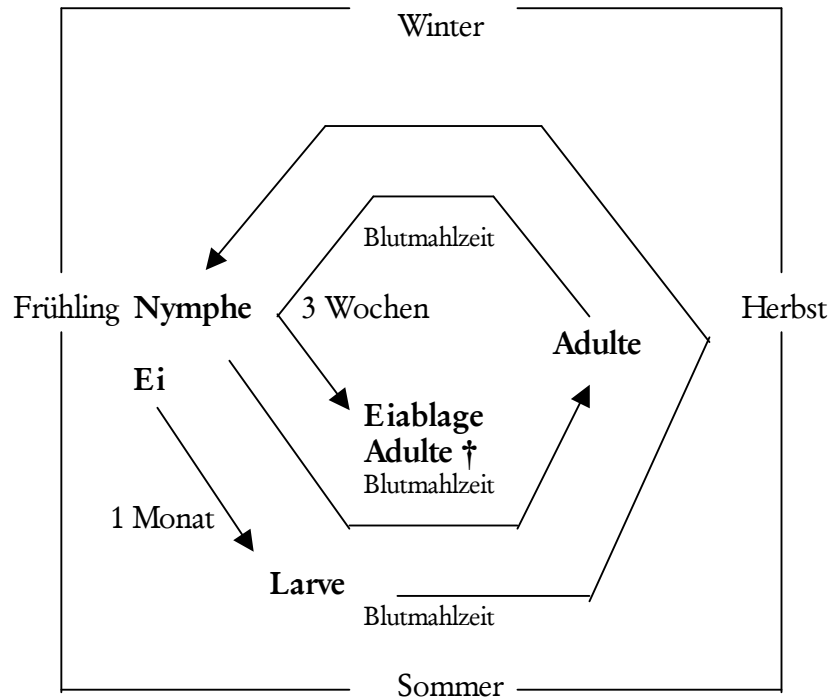


Abbildung 4: Lebenszyklus der Ixodes Zecken, am Beispiel von *Ixodes scapularis*.

1.4.2 Babesiose

Als Überträger und Reservoir der *Babesia* spp. gelten Ixodes Zecken. Die Ausnahme bildet ein Bericht, der eine Zecke, die nicht der Ixodes Familie angehört, *Ornithodoros erraticus*, als Reservoir für *Babesia meri* identifiziert hat (42). Im Fall der Humanen Babesiose (*B. divergens*) wird in Europa *Ixodes ricinus* als Hauptvektor angenommen (8, 40). *Ixodes trianguliceps* überträgt *B. microti* zwischen Nagetieren, scheint aber nur selten Menschen zu infizieren (41).

Die Protozoen werden bei der Blutmahlzeit an einem infizierten Wirt von der Zecke mit den Erythrozyten aufgenommen. Im Intestinaltrakt der Zecken entwickeln sich einige der erythrozytären Stadien zu Gameten (siehe Abbildung 5, A) oder Strahlenkörpern („ray bodies“) (siehe Abbildung 5, B). Diese fusionieren und bilden eine Zygote, die das Intestinum zur sexuellen Vermehrung verlässt und in die Speicheldrüsen der Zecke einwandert (siehe Abbildung 5, C). Im Gegensatz zum HGE-Erreger können Babesien auch transovariell von der weiblichen Zecke auf deren Nachkommen übertragen werden.

Dabei findet die sexuelle Vermehrung der Erreger in den Ovarien der Zecke statt. Alle Entwicklungsstadien (Larve, Nymphe, Adulte) sind somit potentielle Überträger der Infektion. Alternativ reproduzieren sich die Erreger in anderen Geweben wie Lymphknoten-, Speicheldrüsen- oder Fettzellgewebe oder in den Nephrozyten der Larven oder Nymphen (transstadielle Vermehrung) (29). In den Speicheldrüsen formen sich multinukleäre, aber undifferenzierte Sporoblasten (siehe Abbildung 5, D). Im Verlauf der Sporogonie entwickeln sich in diesen undifferenzierten Sporoblasten bis zu 10.000 infektiöse Sporozoiten pro Sporoblast (siehe Abbildung 5, E). Diese schnüren sich als reife Sporozoiten von den Sporoblasten ab (siehe Abbildung 5, F). Wenn die Zecke an einem Vertebraten Blut saugt, werden die Sporozoiten dem Wirt inokuliert (siehe Abbildung 5, G). Es wird angenommen, dass der Speichel der Zecke die Infektion durch seine antiinflammatorische und immunsuppressive pharmakologische Aktivität begünstigt (44). Wie im Fall der Ehrlichiosen scheint die Länge des Saugvorganges die Effektivität der Sporozoitenübertragung direkt zu beeinflussen (43). Durch Invagination dringen die Sporozoiten in die Erythrozyten ein (siehe Abbildung 5, H). Die Sporozoiten differenzieren sich über Schizonten zu Merozoiten und schließlich zu Trophozoiten. Die intraerythrozytären Trophozoiten vermehren sich durch Zweiteilung (asexuelle Vermehrung), genannt Merogonie. Dabei bilden sich die typischen Ring- und Kreuzformen, die beim peripheren Blutausschlag in den Erythrozyten zu sehen sind (siehe Abbildung 5, I). Es entstehen zwei bis vier Merozoiten. Vier dieser Formen werden als Tetrade oder Malteser Kreuz bezeichnet (29). Ein kleiner Teil vermehrt sich nicht, sondern vergrößert sich. Es wird angenommen, dass es sich dabei um Gametozyten handelt, die sich im Intestinum der Zecken weiter differenzieren, um dann als Gameten bei einer Blutmahlzeit übertragen zu werden.

Die meisten Infektionen ereignen sich in den Monaten zwischen Mai und September. Die adulten Zecken saugen im Frühling Blut bevor sie ihre Eier ablegen. Die Zeckenlarven, die im Sommer schlüpfen, nehmen ihre Blutmahlzeit bevorzugt an Weißfußmäusen (*Peromyscus leucopus*) ein. Feldstudien haben gezeigt, dass in Endemiegebieten 40 - 60% der Weißfußmäuse mit *Babesia* spp. infiziert sind (49). Die Larven häuten sich während des Winters und werden im Frühling zu Nymphen, die ebenfalls bevorzugt an Weißfußmäusen Blut saugen. Neben der Übertragung durch Zeckenstich werden vermehrt Infektionen nach Bluttransfusionen beschrieben (45, 46). Darüber hinaus gibt es Fallbeschreibungen perinataler Infektionen von Kindern mit Babesiose (47, 48).

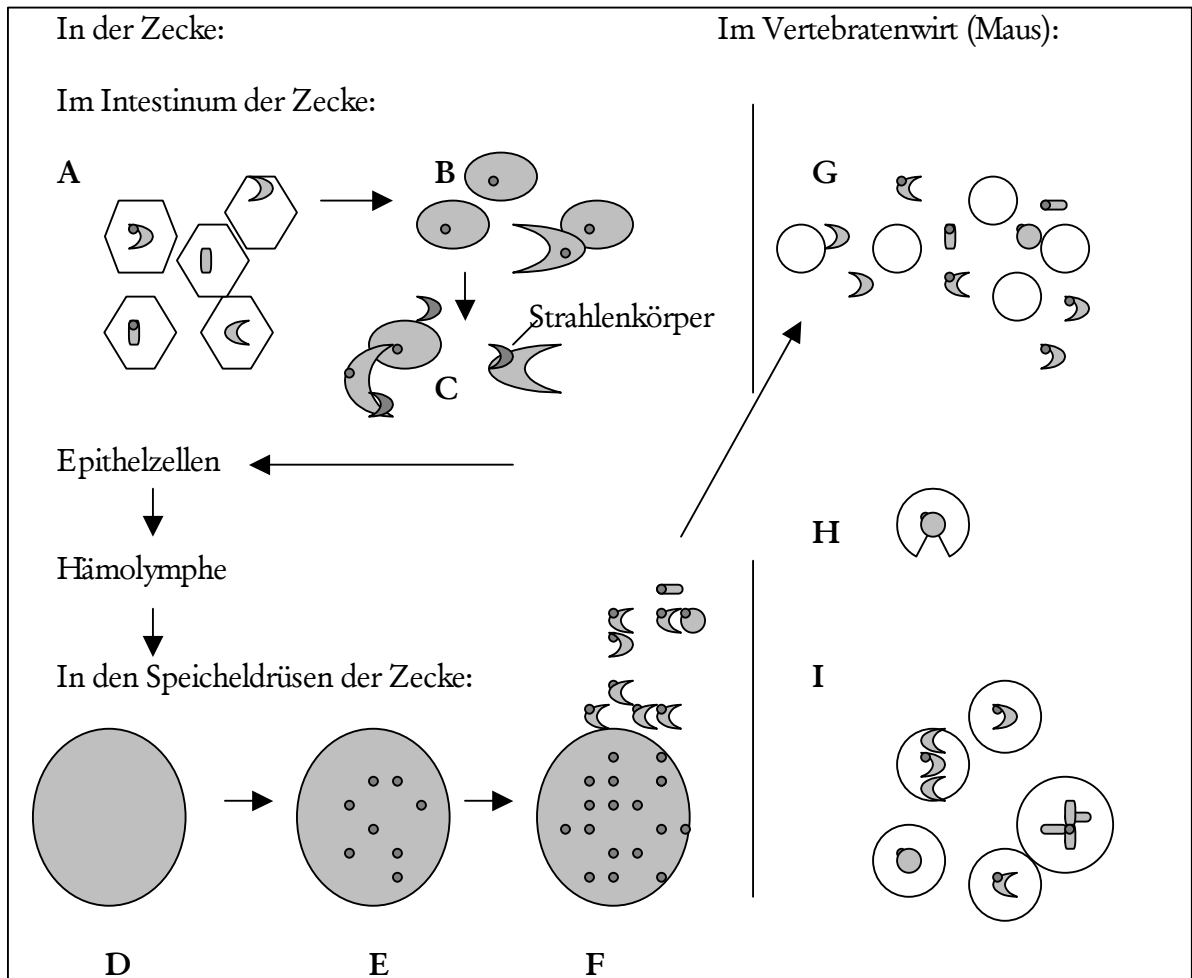


Abbildung 5: Lebenszyklus der Babesien (19).

1.5 Epidemiologie

1.5.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Die geographische Verbreitung von *Ixodes ricinus*-Zecken und das ähnlich ubiquitäre Vorkommen ihres Wirtes, des Weißschwanzhirsches, belegt das Potential für eine hohe Prävalenz der Infektion. Exakte Prävalenz- oder Inzidenzzahlen für Europa liegen hingegen nicht vor. Mit HGE infizierte Zecken wurden aus Deutschland (30, 50, 51), Frankreich (52), Großbritannien (53), Italien (54), Schweden (55), Slowenien (31), den Niederlanden (56), und aus der Schweiz (57, 58) gemeldet. Die Infektionsraten liegen dabei zwischen 0,5% bei Nymphen in der Schweiz (57) und 24,4% bei Nymphen in

Italien (54). In Süddeutschland ergaben Untersuchungen, dass 1,6% bis 4% der adulten *Ixodes ricinus*-Zecken mit granulozytären Ehrlichien infiziert sind (30, 50). Die geographischen Gebiete in Deutschland überlappen sich stark mit den Gegenden, in denen Lyme-Borreliose (LB) endemisch ist. Die Durchseuchung der Zeckenpopulationen mit LB in Süddeutschland liegt bei 21,8% bis 36,2%. Eine Doppelinfektion mit beiden Erregern fand sich bei 0,7% der süddeutschen Zecken (30, 50, 59). Die Verbreitung des HGE-Erregers scheint aber eher fokal als endemisch zu sein (30).

Bei seroepidemiologischen Untersuchungen in Europa wurden Serumantikörper gegen granulozytäre Ehrlichien bei 0% bis 1,5% der Normalbevölkerung sowie bei 3,8% bis 19,5% in Risikopopulationen festgestellt (60, 61, 62, 63, 64, 103). In Deutschland liegt die Antikörperprävalenz zwischen 11,4% und 18% bei Risikokollektiven, sowie zwischen 1,9% und 2,6% in der Normalbevölkerung (51, 65). In Endemiegebieten der USA (Connecticut, Minnesota, New York, Wisconsin) finden sich Seroprävalenzraten von 11% bis 30,1% (66, 67). Eine Koinfektion mit mehr als einem Erreger ist keine Seltenheit. Dabei scheint sich das Krankheitsbild deutlich zu agravieren (68).

Einen Überblick über Vektoren, Wirte und Verbreitung der Ehrlichien gibt Tabelle 1.

Einleitung

Tabelle 1: Überblick über Erscheinungsform, Erreger, Wirt, Vektor und Vorkommen der Ehrlichiosen

<u>Erscheinungsform</u>	<u>Erreger</u>	<u>Wirt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Verbreitung</u>
Monozytär				
HME	<i>E. chaffeensis</i>	Mensch, Wild, Pferd, Hund, Fuchs, Kaninchen	<i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Dermacentor occidentalis</i>	USA (Süden, Südosten), Mexiko, Spanien, Portugal, Mali
Hunde-Ehrlichiose	<i>E. canis</i>	Hund, Mensch	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Weltweit
Sennetsu-Ehrlichiose	<i>N. (E.) sennetsu</i>	Mensch, Hund, Nagetiere	(Fischparasiten?))	Japan, Malaysia
Granulozytär				
Pferde-Ehrlichiose	<i>A. phagocytophila</i> (<i>E. equi</i>)	Pferd	?	USA, Europa
<u>Erscheinungsform</u>	<u>Erreger</u>	<u>Wirt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Verbreitung</u>
Zecken-Fieber	<i>A. (E.) phagocytophila</i>	Schaf, Rind	<i>Ixodes ricinus</i>	Europa

<u>Erscheinungsform</u>	<u>Erreger</u>	<u>Wirt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Verbreitung</u>
HGE	A. phagocytophila (HGE- Erreger)	Mensch, Pferd, Hund, Nagetiere	Ixodes ricinus, Ixodes scapularis, Dermacentor variabilis	USA (Osten, mittlerer Westen), Europa
Ewing- Ehrlichiose	E. ewingii	Hund, Mensch	Amblyomma americanum	USA

1.5.2 Babesiose

Babesien gehören zu den am weitesten verbreiteten Blutparasiten der Welt nach den Trypanosomen. *Babesia microti* ist, wie andere Babesienarten, in Zecken und Nagern in Deutschland endemisch (70). *B. divergens* ist in Europa ein Viehparasit von wirtschaftlicher Bedeutung. Sein Vorkommen erstreckt sich auf Großbritannien, Irland, Frankreich, Belgien, die Schweiz, Holland, Deutschland und Österreich (8).

In Europa wurden seit der ersten Beschreibung einer Babesieninfektionen eines Menschen weitere 31 Fälle beschrieben. Davon gehen 23 auf *B. divergens* zurück (8, 71). Die Inzidenz scheint anzusteigen. Mehr als die Hälfte der 31 Personen erkrankte nach dem Jahr 1985. Die überwiegende Anzahl der Fälle wurden in Großbritannien und in Frankreich beschrieben. Dies ist aber eher auf den größeren Bekanntheitsgrad der Babesiosen in diesen Ländern, als auf eine höhere Prävalenz der Erkrankung zurückzuführen. Infektionen mit *B. bovis*, *B. canis*, *B. microti* und Babesien unbekannter Spezies wurden in Europa anhand morphologischer Charakteristiken und Antigenreaktivität festgestellt. Interessant ist, dass nicht mehr Fälle Humaner Babesiose durch *B. microti* in Europa beschrieben sind, da *B. microti* als Parasit bei Nagern in England, Polen und anderen Teilen Europas sehr häufig dokumentiert wurde. Dies mag auf die geringere Pathogenität des europäischen *B. microti*-Stammes für Menschen im Vergleich zum amerikanischen *B. microti*-Stamm liegen. Alternativ kommt als Erklärungsansatz in Frage, dass die Zecke *Ixodes trianguliceps*, die *B. microti* in den

Nagerpopulationen Europas überträgt, meist an ihrer Brutstätte bleibt und somit selten Menschen infiziert. In den USA sind seit dem Indexfall 1969 mehr als 300 menschliche Infektionen mit *B. microti* aufgetreten (10). Sieben Fälle einer Infektion mit dem WA-1 Typ der Babesien, der mit *B. microti* nur entfernt verwandt ist (72), wurden aus dem Westen der USA gemeldet (73). Einige weitere Beschreibungen von Fällen Humaner Babesiose liegen aus China (8), Taiwan (74), Südafrika (75) und Mexiko (8) vor.

1.6 Pathologie und Immunpathogenese

1.6.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Gemäß den mikroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen sind die am stärksten involvierten Organe einer HGE-Infektion die des monozytären Phagozytensystems. Insbesondere finden sich Veränderungen an Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark. Diese zeigen meist eine diffuse retikuloendotheliale Hyperplasie (vermehrte Monozyten/Makrophagen-Infiltration) (59). Perivaskuläre lympho-histiozytäre Infiltrate dominieren bei anderen Organen, wie Magen-Darm-Trakt, Niere, Nebenniere, Herz, ZNS und Meningen. Das Knochenmark ist meist hyperzellulär infolge myeloischer Hyperplasie und Megakaryozytose, in zwei Drittel der Fälle findet man Granulome (59). Trotz der Klinik, die einen Defekt in der intravaskulären Integrität nahe legt, ist keine Vaskulitis präsent. Die Pathogenese ist noch nicht im Einzelnen aufgeklärt. Die HGE-Erreger scheinen unter anderem die Apoptose der Granulozyten, deren Lebensspanne sonst für ihre Replikation zu kurz wäre, zu verhindern (76). Ob Ehrlichien die Zellen direkt schädigen, eine pathologische Entzündungskaskade hervorrufen, oder beides bewirken, ist noch unbekannt.

Die Immunkompetenz des Wirtes erlaubt eine entsprechende protektive Antwort auf die Infektion, die wahrscheinlich von nachteiligen Immunreaktionen begleitet wird. Die Balance zwischen induzierter protektiver Immunität und entzündlicher Wirtszellschädigung determiniert die Schwere der Erkrankung. Ein Teil des klinischen Krankheitsbildes scheint auf die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen zurückzugehen. Diese könnten auch einen Erklärungsansatz für die Zytopenien geben. Dabei produzieren HGE-infizierte Zellen aber nicht die klassischen proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (77). Die zellvermittelte Immunantwort scheint Interferon- γ (IFN- γ) dominiert zu sein (78).

Histologisch nachweisbare Granulome deuten eine Stimulation des Immunsystems an. Erfolgt diese Granulombildung nicht, beispielsweise bei HIV-Infektion, nach Splenektomie oder immunsuppressiver Therapie, ist mit einem schweren Krankheitsverlauf mit dem Bild von opportunistischen Infektionen zu rechnen (79). Im Mausmodell haben immunkomprimierte Mäuse eine höhere Erregerlast, mehr Gewebspathologie und persistierende Infektionen (80). Außerdem existieren Überlegungen, ob eine vorangegangene HGE-Infektion nach Immunsuppression (Splenektomie) reaktiviert werden könnte (12). Persistierende Infektionen scheinen möglich zu sein.

1.6.2 Babesiose

Es wird angenommen, dass die Pathogenese der Babesiose der Pathogenese der Malaria sehr ähnlich ist. Das Fieber wird auf den Zerfall befallener Erythrozyten und endogener Pyrogene zurückgeführt. Die Anämie ist durch den Zerfall der Erythrozyten, sowie durch Autoantikörper, Myelosuppression und Splenomegalie bedingt. Die anfallenden Produkte des Erythrozytenzerfalls und des Parasitenstoffwechsels führen zur Belastung der Organe des monozytären Phagozytensystems, insbesondere der Milz (Splenomegalie). Der Hypersplenismus führt außerdem zu Thrombozytopenie und Neutropenie. Zu Mikrozykulationsstörungen und Gewebeischämie mit petechialen Blutungen und Nekrosen in den betroffenen Organen kann es durch die Bindung von befallenen Erythrozyten untereinander und an Rezeptoren von Endothelzellen kommen. In schweren Fällen entsteht durch intravasale Autoimmunhämolyse eine Hämoglobinämie und -urie.

Die im Fall von *Babesia divergens* herausragende Rolle der Milz an der Pathogenese legt deren Fehlen als Hauptrisikofaktor für eine Infektion mit *B. divergens* nahe. Persistierende Parasitämien nach akuter Babesiose wurden beschrieben (81). An der Immunantwort auf *B. spp* sind humorale und zelluläre Faktoren beteiligt. Beim ersten Kontakt des Wirtes mit dem Antigen können IgG-Antikörper an freie Sporozoiten im Plasma binden und sie so im Tierversuch neutralisieren, um eine Infektion zu verhindern (82). Nachdem sich die Parasiten in ihren Zielzellen, den Erythrozyten, etabliert haben, steigt die Parasitämie stetig an. Im Rahmen der unspezifischen Immunantwort kontrollieren wahrscheinlich Natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen (MO) die Wachstumsrate durch Produktion von IFN- γ (NK) und TNF- α , Stickoxid (NO) und ROS (Makrophagen) (83). Unklar ist, wie diese Moleküle mit dem Erregerwachstum

interferieren. Für die Eliminierung des Erregers scheinen T-Zellen (vor allem CD4+) die entscheidende Rolle zu spielen. Im Tierversuch war es ausreichend, purifizierte T-Lymphozyten von immunen Mäusen auf native Mäuse zu übertragen, um diese zu immunisieren (84). Der Mechanismus der Eradikation und die Rolle der INF- γ -Produktion der CD4+T-Lymphozyten für die Erregerelimination ist unklar.

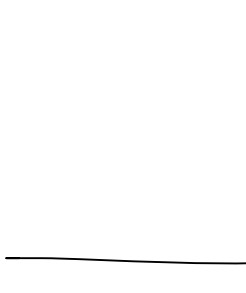
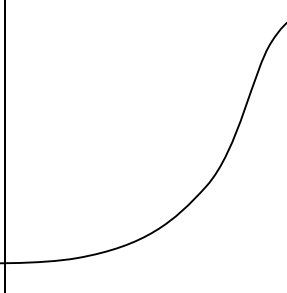
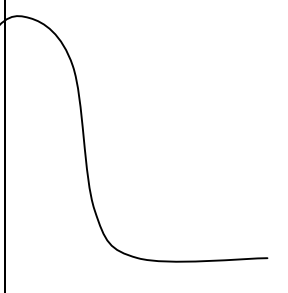
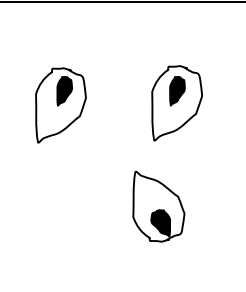
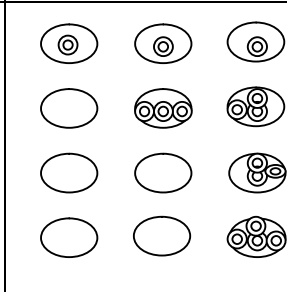
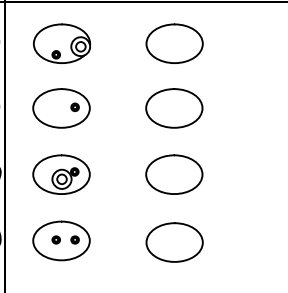
	A	B	C
	Einnistung	Progression	Eliminierung
Parasitämielevel			
Erscheinungsform der Parasiten			
Entzündungsfaktoren	Ig	IFN- γ TNF- α NO ROS	IFN- γ
Mediatorzellen	B-Lymphozyten	NK MO	T-Lymphozyten

Abbildung 6: Komponenten der Immunantwort auf eine Babesieninfektion.

1.7 Diagnostik

1.7.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Es gibt mehrere Methoden zum mikrobiologischen Nachweis einer Ehrlichiose. Als Untersuchungsmaterial kommen Akut- und Rekonvaleszenzseren, EDTA-Blut und eventuell Liquor und Knochenmark in Frage. Durch einfache Giemsa-Färbung eines peripheren Blut- oder Knochenmarkausstrichs oder buffy coat (Leukozytenfraktion des Blutes) lassen sich intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Granulozyten nachweisen. Dies erfordert die sorgfältige Durchmusterung von 800 bis 1000 Leukozyten

durch einen erfahrenen Untersucher, da die Zahl der infizierten Leukozyten kleiner als 0,2% sein kann. Gut geeignet zum Nachweis einer akuten Ehrlichieninfektion ist die PCR – insbesondere „nested“-PCR. Die gebräuchlichen Methoden haben aber bis jetzt keine zufrieden stellende klinische Sensitivität (85). Die Anzucht der Ehrlichien in Zellkultur, bei HGE in HL60-Zellen oder ISE6-Zellen (embryonale Zeckenzellen) gilt als Goldstandard, ist aber sehr zeitaufwendig und schwierig (25, 85).

Die Serologie ist zur Akutdiagnostik weniger geeignet, da die diagnostisch verwertbaren Antikörper oft erst ein bis vier Wochen nach Krankheitsbeginn nachweisbar sind und dann über mehrere Jahre persistieren können (36, 66). Die Serologie gilt aber als sensitivste Methode zur nachträglichen diagnostischen Bestätigung einer abgelaufenen Infektion. Als positiv gilt in der Serologie eine Serokonversion (Titer > 1:64), ein vierfacher Titeranstieg innerhalb von 10 bis 14 Tagen sowie ein einzelner hoher Serumantikörpertiter (Titer > 1:128) bei entsprechender Klinik (12).

1.7.2 Humane Babesiose

Bei geringer Parasitämie ist die Auswertung eines Giemsa-gefärbten Blutausstriches unter Öl-Immersion die Methode der Wahl. Auch die Auswertung eines „Dicken Tropfens“, ähnlich dem in der Malariadiagnostik, ist möglich. Die Einschlüsse in den Erythrozyten (Merozoiten) sind bei einer Infektion mit *B. microti* 1,5 – 2,0 µm groß, die Merozoiten bei einer Infektion mit *B. divergens* variieren je nach infiziertem Wirt (1,0 – 3,0 µm) (8).

Die Erscheinungsform der Erreger im peripheren Blutausstrich ist sehr variabel. Sie reicht von einfachen Ringformen über birnenförmige (piriforme) Trophozoiten zur Tetraden- oder „Maltese cross“-Formen. Die Unterscheidung von *Plasmodium* spp. ist durch das fehlende Pigment Hemozoin möglich. Auch lassen sich im Fall der Babesiose keine Schizonten oder Gametozyten im Blutausstrich nachweisen.

Eine weitere diagnostische Möglichkeit besteht in der Inokulation erregerrhaltigen Materials in Tiere (im Fall von *B. microti* werden meist Hamster, im Fall von *B. divergens* Kälber verwendet), bei denen nach geeigneter Zeit nach spezifischen Veränderungen gesucht wird. Dies ist sensitiv, aber zeitaufwendig (1 - 6 Wochen) und teuer. Die DNA-Amplifikation durch PCR scheint noch sensitiver und ebenso spezifisch zu sein wie die Mikroskopie, besonders bei niedrigen Parasitämien oder subklinischen

Infektionen (86). Im Vergleich hat sie sich als so spezifisch und sensitiv erwiesen wie die Hamster-Inokulation (87). Es existieren allerdings noch kaum standardisierte Testprotokolle. Bei chronisch infizierten Individuen scheint die Sensitivität wegen der geringen Zahl an Parasiten in der Probe geringer zu sein. Durch Sequenzierung des DNA-Produktes erlaubt diese Methode auch die Identifikation der Spezies und hat zur Beschreibung neuer Spezies beigetragen (72). Der IFT ist der serodiagnostische Test der Wahl, um Antikörper gegen Babesien nachzuweisen.

1.8 Klinik

1.8.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Das klinische Bild der HGE ist häufig das einer unspezifischen fieberhaften Erkrankung. Die Ausprägung reicht von einem milden, selbstlimitierenden Verlauf bis zu schweren Krankheitsfällen mit Todesfolge. Unter anderem ist ein Todesfall durch mit HGE assoziierter Perikarditis beschrieben (90). Die Letalität wird in der Literatur mit 0,7% bis 5% angegeben (12, 36, 88). Über die Hälfte der Infektionen verläuft asymptomatisch. Die Schwere des Krankheitsbildes scheint unter anderem vom Immunstatus des Patienten abzuhängen. Offensichtlich limitierende Faktoren sind fortgeschrittenes Alter und begleitende chronische Grunderkrankungen. Etwa die Hälfte der Patienten wird vorübergehend hospitalisiert (36). Nach einer Inkubationszeit von 7 - 10 Tagen manifestiert sich die Ehrlichiose mit grippeähnlichen Prodromi. Hohes Fieber ($>39^{\circ}$ C) bestimmt den Krankheitsverlauf. Daneben sind Schüttelfrost, Schweißausbruch, Schwindel, schwere Kopfschmerzen, Myalgien und Arthralgien charakteristisch (36). Über eine Beteiligung des Magen-Darm-Traktes mit Nausea, Anorexie, Erbrechen, Diarrhöe und Bauchschmerzen wird ebenfalls häufig berichtet. Bauchschmerzen sind allgemein für die Erkrankung eher untypisch, waren aber die dominierende Klinik bei einem Kind mit HGE, was auf die breite Fächerung der klinischen Symptomatik hinweist (91). Auch eine leichte Hepatitis kommt vor. Eine Lungenbeteiligung mit unproduktivem Husten findet sich bei einem Drittel der Patienten. Etwa 10% zeigen einen unspezifischen Hautausschlag mit erythematösem bis pustulösem Erscheinungsbild (11). Dumler et al. (12) halten einen Hautausschlag aber für eher untypisch für HGE, wonach das Vorkommen eines solchen eher als Hinweis für das Vorliegen einer anderen fieberhaften Erkrankung gedeutet werden sollte. Aufgrund des immunsuppressiven Effekts, der dem HGE-Erreger zugeschrieben wird, können Sekundärinfektionen durch nosokomiale Erreger oder opportunistische Pathogene als charakteristische Komplikationen

vorkommen. Außerdem können eine akute Niereninsuffizienz (89), akute respiratorische Insuffizienz (ARDS), Toxic Shock Syndrom (TSS)-ähnliche Symptomatik mit Multiorganversagen, ZNS-Beteiligung - es sind septische Meningitis, Enzephalitis, Hirnnervenlähmung, periphere Neuropathie, und demyelinisierende Polyneuropathie beschrieben (21, 22, 66) - und Hämorrhagien den Krankheitsverlauf komplizieren.

Häufige Laborbefunde, die auf eine HGE-Infektion hinweisend sein können, sind Leukozytopenie ($<3 \times 10^9$ pro Liter) - oft mit Linksverschiebung - und Thrombozytopenie (oft $<100 \times 10^9$ pro Liter) oder Panzytopenie (11, 12, 36, 59). Seltener beobachtet werden Anämie, eine Erhöhung der Serumaminotransferasen (GOT, GTP), der Alkalischen Phosphatase und der LDH (12). Als unspezifische Entzündungsparameter finden sich oft Erhöhungen des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (36, 59, 93). Gelegentlich zeigen die Patienten auch Laborwerte, die die Mitbeteiligung spezifischer Organsysteme, wie etwa der Leber oder der Niere (Kreatinin- und Harnstofferrhöhung), suggerieren.

Die Krankheitsdauer variiert von wenigen Tagen bis hin zu zwei Monaten. Ein verlängertes Intervall zwischen Krankheitsbeginn und Therapie ist mit einem schwereren Verlauf assoziiert. Da die Klinik aber in den meisten Fällen relativ unspezifisch ist, müssen zahlreiche Erkrankungen, wie Lyme-Borreliose, Babesiose, Leptospirose, Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), Tularämie, Brucellose, Typhus, Rückfallfieber, virale Infektionen (FSME, Influenza), Autoimmunerkrankungen und Leukämien, in die Differentialdiagnose einbezogen werden.

1.8.2 Babesiose

Für Babesiosen sind grippeähnliche Symptome einschließlich hohen Fiebers ($40 - 41^\circ \text{C}$), Husten, Müdigkeit, Schwäche, Anorexie, Myalgien und Erbrechen beschrieben (92). Diese treten meist nach einer Inkubationszeit von 1 - 4 Wochen nach einem Zeckenstich auf. Die akut fieberhafte Erkrankung geht oft mit einer hämolytischen Anämie einher. Die Babesiose ist in ihrer klinischen Präsentation der Malaria sehr ähnlich, mit Ausnahme der zerebralen Manifestation bei *P. falciparum*, die bei Babesiose nicht vorkommt (94). Etwa eine Woche nach Krankheitsbeginn zeigen die Patienten, abhängig vom Grad der intravaskulären Hämolyse, Hämoglobinurie und Ikterus. Teilweise assoziiert mit Hepato- oder Splenomegalie (92). Bei fulminantem Verlauf kommt es in

Einzelfällen zu Schocksymptomatik, disseminierter intravaskulärer Gerinnung mit Hypotension, Petechien und Ekchymosen, Niereninsuffizienz und Lungenstauung. Hautausschlag ist im Gegensatz zum RMSF eher untypisch. Zeichen einer Einbeziehung des Nervensystems sind schwere Kopfschmerzen, Photophobie, alterierte Gefühlswahrnehmung und emotionale Labilität. Charakteristische Laborbefunde sind Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie. Oft wird auch eine milde Erhöhung der Leberwerte beobachtet. Bei intravaskulärer Hämolyse ist ein Anstieg des indirekten Bilirubins zu verzeichnen (92).

Als weitere Komplikationen können begleitendes Herzversagen, ARDS, bis hin zu generalisiertem Organversagen auftreten. Die meisten Infektionen verlaufen aber bei immunkompetenten Personen subklinisch oder als selbstlimitierende Grippe-ähnliche Erkrankungen (95). Komplikationen begünstigende Faktoren sind fortgeschrittenes Alter (92, 96) Asplenie und Immundefizienz (97), im Rahmen von AIDS, nach Organtransplantation (98), sowie infolge Chemotherapie bei Krebserkrankungen. Persistierende chronische Infektionen, die sich bei reduzierter Immunkompetenz oder nach Splenektomie erneut manifestieren, wurden beschrieben (81, 98). Infektionen mit dem in Europa vorherrschende Erreger *B. divergens* wurden überwiegend bei splenektomierten Patienten beobachtet. Die dabei auftretenden Symptome sind akuter als im Fall von *B. microti* und öfter lebensbedrohlich.

1.9 Therapie

1.9.1 Humane Granulozytäre Ehrlichiose

Die HGE ist therapeutisch gut zu beeinflussen. Wirksam sind Antibiotika aus der Tetracyklingruppe, wesentlich ist die Zellgängigkeit des Medikamentes. Neuere Fluorochinolone sowie Rifampicin bieten weitere therapeutische Möglichkeiten. Diese Alternativen kommen bei Patienten mit Tetracyclinunverträglichkeit, bei Kindern sowie in der Schwangerschaft (nicht im 1. Trimenon) in Frage. In der Regel tritt 24 h nach Therapiebeginn eine deutliche Verbesserung des klinischen Bildes ein (36, 66). Die Behandlung ist 10 - 14 Tage fortzusetzen. Auch ohne antibiotische Behandlung verlaufen viele Fälle unproblematisch und heilen folgenlos aus. Da aber der Verlauf bei Beginn der Klinik nicht vorhergesehen werden kann, wird bei jeder HGE-Infektion eine antibiotische Therapie empfohlen. Eine prophylaktische Intervention nach Zeckenstich in endemischen

Gegenden wird kontrovers diskutiert. Eine Impfung steht in absehbarer Zeit nicht zur Verfügung (59).

1.9.2 Babesiose

Die empfohlene Therapie bei Babesiose besteht aus einer Kombinationstherapie mit Chinin (Synonym Quinine, Chininium dihydrochloricum®) und Clindamycin für 7 - 10 Tage. Als häufigste unerwünschte Wirkungen treten Tinnitus und Diarrhöe auf. Alternativ ist die Behandlung mit Atovaquon, einem Antiprotozoenmittel (Hydrozynamptichinon) und Azithromycin (Zitromax®), einem Makrolid-Antibiotikum mit bakteriostatischer Wirkung und langer Halbwertszeit, möglich (99). Bei HIV-infizierten Patienten müssen eventuell noch andere Medikamente hinzugefügt werden. Bei Patienten unter immunsuppressiver Therapie nach Organtransplantation kann eine Erniedrigung der Dosis der Immunsuppressiva notwendig werden. In schweren Fällen mit hoher Parasitämie und intravaskulärer Hämolyse sind Blutaustauschtransfusionen als lebensrettende Maßnahme beschrieben (92). Um einer fulminanten Verlaufsform der Infektion vorzubeugen, wird vorgeschlagen, auch Patienten ohne klinische Symptomatik zu behandeln. Persistierende Infektionen sind auch bei Besserung der Klinik und nicht mehr nachweisbarer Parasitämie häufig. Eine spätere Verschlechterung des Patientenzustandes ist jederzeit möglich.

2 Zielsetzung

Durch den zunehmenden Anteil von älteren, immunsupprimierten Patienten mit zahlreichen Begleiterkrankungen gewinnen die potentiell tödlichen Krankheiten - Humane Granulozytäre Ehrlichiose und Babesiose - an Aktualität. Die zunehmende Zahl HIV-positiver Individuen und die ansteigende Zahl an Patienten, die eine immunsuppressive Chemotherapie infolge einer Transplantation oder eines Tumorleidens erhalten, wird die Zahl der symptomatisch an Ehrlichiosen und Babesiosen Erkrankten weiter ansteigen lassen. Wird die Diagnose HGE/Babesiose schon zu Krankheitsbeginn gestellt, ist die Infektion antibiotisch sehr gut zu kontrollieren. Aus diesem Grund ist es wichtig, den Bekanntheitsgrad der von Zecken übertragenen Krankheiten zu erhöhen, um HGE und Babesiose in die Differentialdiagnose fieberhafter Erkrankungen nach Zeckenbiss mit aufzunehmen.

Die Variabilität und die klinische Breite der bekannten von Zecken übertragenen Erkrankungen könnten auf inapparente Konfektionen mit unbekanntem Mikroorganismen hindeuten. Ziel dieser Arbeit ist es somit auch, auf den in Deutschland wachsenden Untersuchungs- und Forschungsbedarf auf dem Gebiet der durch Zecken übertragbaren Krankheiten hinzuweisen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Seroprävalenz von Antikörpern gegen die Erreger der Humane Granulozytäre Ehrlichiose und Babesiose in einem speziellen Risikokollektiv von Waldarbeitern aus Süddeutschland. Als stark zeckenexponierte Bevölkerungsgruppe sind Waldarbeiter einem höheren Risiko ausgesetzt, an TOBB (tick-borne disease other than *Borrelia burgdorferi*) zu erkranken. So ließ sich erwartungsgemäß in vergleichbaren Studien mit durch Lyme-Borreliose infizierte Patienten als Risikokollektiv eine höhere Durchseuchungs- und Infektionsrate als bei nicht zeckenexponierten Personen belegen. Als Vergleichskollektiv wurden gesunde Blutspender gewählt, die im Rahmen einer vorhergehenden Studie auf HGE-Antikörper getestet wurden.

In Deutschland sind bis heute noch keine autochthonen Fälle von HGE bekannt. Dies dürfte unter anderem auf den geringen Bekanntheitsgrad der Krankheit und die nicht immer zur Verfügung stehenden diagnostischen Möglichkeiten zurückzuführen sein. Die hohen Serumantikörpertiter bei Risikokollektiven weisen hingegen stark auf ein

Vorkommen der Erreger in Süddeutschland hin. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit versucht, aus dem Blut von Patienten mit aktiver Borreliose den HGE-Erreger mit hochsensitiven DNA-Nachweismethoden (PCR) aufzuspüren.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 IFT

3.1.1.1 Waldarbeiterseren

Aus einem Risikokollektiv von Waldarbeitern aus Süddeutschland (Großraum München) wurden 490 Patienten ausgewählt, die wegen fieberhafter Erkrankungen einen Arzt aufgesucht hatten. Die Blutproben wurden von geschultem Klinikpersonal entnommen und bei -22°C in 1,8 ml Kryoröhrchen (NUNC) eingefroren.

Die Seren waren im Vorfeld auf eine vorliegende Lyme-Borreliose serologisch getestet worden. Die Antikörpertiter für IgM und IgG wurden getrennt bestimmt. Alle Seren wurden mittels ELISA auf Antikörperreaktivität getestet. Fiel dieser im Fall von IgG positiv aus, wurde das Serum mit einem IFT gegengetestet. War dieser positiv oder grenzwertig, wurde das Serum als positiv bewertet. Im Fall eines eingeschränkt positiven ELISA und eines positiven IFT wurde ebenfalls ein positives Ergebnis angenommen. Ein negativer IFT wurde erneut mit einem Westernblot (WB) überprüft, dessen Ergebnis als ausschlaggebend angesehen wurde.

Von 490 Patientenseren wiesen 67 (13,7%) IgG-Antikörper gegen Borrelien auf.

IgM-Antikörper wurde ebenfalls mit einem ELISA nachgewiesen, der im Fall eines ebenfalls positiven μ -Capture (Spezifisches IgM- Nachweisverfahren) als positiv gewertet wurde. In einigen Fällen wurde außerdem ein IgM-IFT durchgeführt, der aber nur, aufgrund möglicher unspezifischer Ergebnisse, in Zusammenhang mit einem positiven ELISA als positiv angesehen wurde. IgM-Antikörper wiesen 19 (3,9%) der Seren auf. Ausschließlich IgM-Antikörper fanden sich in 11 (2,2%) der Seren. In 78 (15,9%) Patientenseren fanden sich somit Borreliose spezifische Antikörper. Von diesen wiesen 8 (1,6%) sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper auf. Einen Überblick über die Antikörperverteilung gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Verteilung der Antikörpertiter gegen *B. burgdorferi* im Kollektiv der Waldarbeiter.

	<u>Anti-LB positiv</u>	<u>Anti-LB IgG positiv</u>	<u>Anti-LB IgM positiv</u>	<u>Anti-LB IgG und IgM positiv</u>
Waldarbeiter n=490	78 (15,9%)	67 (13,7%)	19 (3,9%)	8 (1,6%)

3.1.1.2 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 263 gesunden Blutspendern aus dem Raum Würzburg ohne Vorgeschichte im Bezug auf Zeckenbisse, rheumatologische oder neurologische Erkrankungen. Die Ergebnisse des HGE-IFT dieser Seren wurde in einer dieser Arbeit vorausgegangenen Untersuchung zur HGE-Prävalenz bei LB-Patienten der Universitätshautklinik Würzburg durchgeführt. Dabei wiesen 4 (1,5%) der Blutspender Antikörper gegen Ehrlichien auf. Ein Serum (0,4%) enthielt IgM-Antikörper, ein weiteres (0,4%) wurde als eingeschränkt positiv bewertet. Dabei wiesen zwei der vier IgG positiven Blutspender auch IgG-Antikörper gegen Borrelien auf. Ein Serum enthielt zusätzlich IgM-Antikörper gegen Borrelien. In dem HGE-IgM positiven Serum der Blutspender fanden sich keine Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi*. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Antikörperverteilung im Blutspenderkollektiv.

Tabelle 3: Verteilung der Antikörpertiter gegen HGE im Kollektiv der gesunden Blutspender.

	<u>Anti-HGE- positiv</u>	<u>Anti-HGE IgG positiv</u>	<u>Anti-HGE IgM positiv</u>	<u>Anti-HGE IgG und IgM positiv</u>
Blutspender n= 263	5 (1,9%)	4 (1,5%)	1 (0,4%)	0

3.1.1.3 HGE-IFT-Kit

Zur Bestimmung der Serumantikörperreaktivität wurden kommerziell verfügbare Test-Kits der Firma MRL-Diagnostics, USA, verwendet. IgM- und IgG-Antikörpertiter wurden getrennt bestimmt. Der MRL-Diagnostics HGE-IFT benutzt HGE-1 infizierte HL60 Zellen als Antigene. Das von der Firma Genzyme Virotec kommerziell vertriebene Kit beinhaltet:

Mit HGE infizierten HL60 Zellen beschichtete Objektträger mit je 8 Testfeldern; Pretreatment-Lösung (12 ml) aus PBS (phosphate buffered saline) und monospezifischen Ziegenantiserum – nur im Fall des IgM-Kits - ; IgG- bzw. IgM-Konjugat aus Evan's Blau-Lösung und gereinigten, fluoreszin-gekoppelten Ziegenantikörpern; IgG- bzw. IgM-Positivkontrolle aus menschlichem Serum (0,3 ml); Negativkontrolle aus menschlichem Serum (0,25 ml); PBS-Pulver; Eindeckmedium aus PBS-gepuffertem Glycerol (pH = 7,2) (2,5 ml).

3.1.1.4 Babesien-IFT

Für den Nachweis der Babesien wurden zusätzlich Objektträger der Firma Virotech, beschichtet mit Babesien infizierten Erythrozyten, verwendet. Des Weiteren fand eine Babesien spezifische IgG-Positivkontrolle aus menschlichem Serum (0,3 ml) Anwendung. Alle übrigen Reagenzien wurden entsprechend dem HGE-IFT-Kit verwendet.

3.1.1.5 Geräte und Zubehör

Zentrifuge (Hettich); Kühlschrank 2 - 8° C (Genheimer); Kühlschrank -22° C (Genheimer); Fluoreszenzmikroskop (Leitz); Schüttler (Edmund Bühler, KS 10); Vortex (Bender und Hohbein AG); Inkubator 37° C (Haeus Instruments); geeichte Pipetten (Eppendorf); Pipettenspitzen (Eppendorf); Feuchte Kammer (Waca); Färbeküvetten (Duran); 1-Liter Messzylinder (Schott); Reaktionsgefäße 1,5 ml (Greiner); Kryoröhrchen (Brand); Deckgläser 24 x 60 mm (Knittel-Gläser); Destilliertes Wasser (Fresenius).

3.1.2 PCR

3.1.2.1 Patienten-Heparinvollblut

Die für die PCR-Untersuchung ausgewählten Patienten mit akut fieberhafter Erkrankung nach Zeckenstich wiesen entweder IgM-Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* (n= 9) -

nach oben genannten Kriterien - oder IgM-Antikörper gegen Humane Granulozytäre Ehrlichiose (n= 1) auf. Verwendet wurden 20 ml heparinisieretes Vollblut.

3.1.2.2 Granulozytenseparation

Leukozytenseparationsmedium (PAA Laboratories); Bluecap-Röhrchen (Falcon/Becton Dickinson); PBS (MRL-Diagnostics); 50ml-Glaskolben (Schott Duran); 10 ml-Messpipetten (Furtuna); Pipettierhilfe (Tecnomara); Zentrifuge (Hettich Universal 30RF); Destilliertes Wasser (Fresenius); 5M NaCl-Lösung (Merck); Absaugvorrichtung (Hartenstein).

3.1.2.3 DNA-Isolierung

QIAamp DNA Mini-Kit (Proteinase-K-Stammlösung; Buffer AL; QIAamp Spinsäulen; 2 ml-Collection-Tubes; Buffer AW1; Buffer AW2; Buffer AE) (Qiagen); Thermomixer (Eppendorf); Vortex (Bender und Hohbein AG); Zentrifuge (Hermle Z160M); Ethanol (96 - 100%) (Sigma-Aldrich); 2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt); Kühlschrank -22° (Genheimer).

3.1.2.4 Nested PCR/epank1Gen-PCR

PCR-Master-Kit

Das von der Firma Roche Diagnostics GmbH kommerziell vertriebene Kit enthält zehn Gefäße je 0,5 ml Volumen eines doppeltkonzentrierten PCR Master Mix. Dieser Mix enthält 25U Taq DNA Polymerase in 20mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3mM MgCl₂, dNTP Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 0,4 mM), Brij 35, 0,01% (v/v), bei einem pH-Wert von 8,3 (20° C). Außerdem stellt das Kit fünf Gefäße mit je 1 ml sterilem Wasser für PCR-Zwecke zur Verfügung.

Primer

Für die Nested-PCR kamen folgende Primerpaare zum Einsatz:

Ehr 521 (5' - TGT AGG CGG TTC GGT AAG TTTA AAG - 3')

Ehr 747 (5' - GCA CTC ATC GTT TAC AGC GTG - 3')

Ehr 552 (5' - GCC AGG GCT TAA CCC TGG AGC - 3')

Ehr 706 (5' - TCC TGT TTG CTC CCC ACG CTT TC - 3') (MWG-Biotech)

Zur Amplifizierung des epank1 Gens wurden untenstehende Primer verwendet:

LA6 (5' - GAG AGA TGC TTA TGG TAA AGC - 3')

LA1 (5' - CGT TCA GCC ATC ATT GTG AC - 3') (MWG-Biotech)

Geräte und Zubehör

Kühlschrank 2 - 8° C (Genheimer); Kühlschrank -22° (Genheimer); Abzug (Heraeus Instrumenta); Zentrifuge (Hermle Z160 M); Vortex (Vortex Genie2); PCR-Automat (Perkin Elmer); 2 ml-Reaktionsgefäße (Sarstedt); 0,2 ml-Mikrozentrifugenröhrchen (Perkin Elmer); geeichte Pipetten (Eppendorf); Pipettenspitzen (Eppendorf); HGE-DNA aus mit HGE-Erregern infizierten HL60 Zellen als Positivkontrolle; zwei Negativkontrollen aus Wasser und negativer menschlicher DNA, Gelkammer (Hartenstein); Elektrophoresegerät (Biometra); TAE-Puffer (Life Technologies); Loading Dye (Fermentas); Agarose (Sigma-Aldrich); Ethyldibromid (Sigma-Aldrich), Mikromat (AEG), DNA-Längenstandard (Roche Diagnostics); 50 ml-Messpipette (Fortuna); 100 ml-Glaskolben (Schott Duran); UV-Lichtgerät (Hartenstein); Polaroid Kamera (Electrophoresis Hood 0,7X); Filme (Polaroid 667).

3.1.2.5 Realtime-PCR

LightCycler-Faststart DNA Master SYBR Green I-Kit

Das von der Firma Roche vertriebene Kit enthält drei Gefäße mit je 64 µl LightCycler-Faststart DNA Master SYBR Green I, ein Gefäß mit 1 µl Magnesiumchloridlösung und zwei Gefäße mit sterilem Wasser für PCR Zwecke.

Primer

Bei der Realtime-PCR mit dem Lightcycler wurden folgende Primer verwendet:

GER 3 (5' - TAG ATC CTT AAC GGA AGG GCG - 3')

GER 4 (5' - AAG TGC CCG GCT TAA CCC GCTGGC - 3') (MWG-Biotech)

LightCycler Instrument (Roche)

Das Light-Cycler System besteht aus der Kombination zweier verschiedener Instrumente,

aus einem PCR-Automat sowie einem integrierten Fluoreszenzmessgerät, das eine kontinuierliche Fluoreszenzmessung erlaubt (siehe Abb. 7).

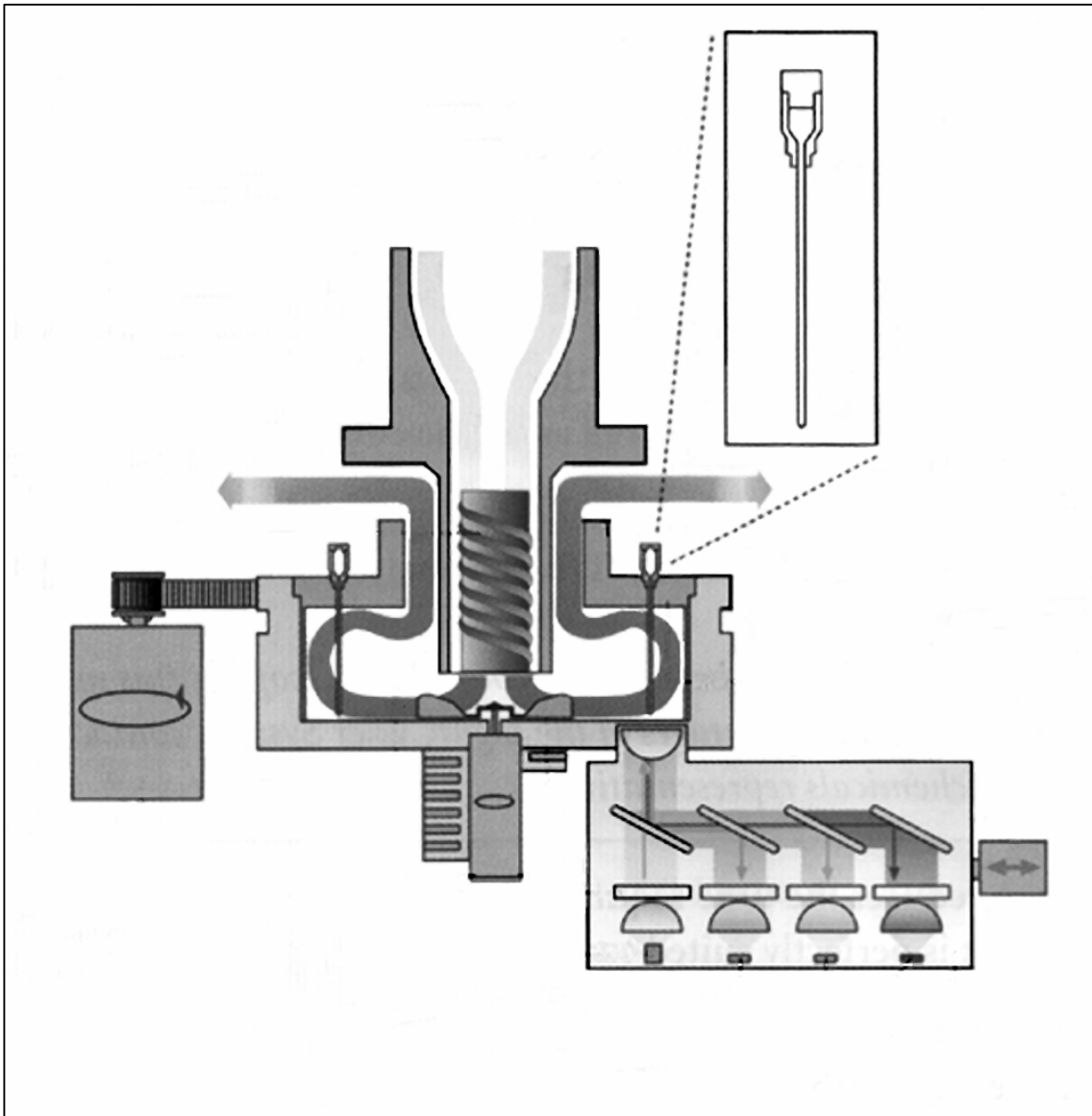


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Light-Cyclers der Firma Roche.

Durch den angeschlossenen Personal Computer ist die Analyse der Ergebnisse bereits während der Versuchsdurchführung online möglich. Die Wärmekammer des PCR-Automaten ist direkt mit dem optischen System des Fluoreszenzmessgerätes verbunden. Der PCR-Automat arbeitet mit heißer Luft als Hitzetransfermedium, was einen schnellen

Temperaturanstieg und –abfall erlaubt. So reduziert sich die Zeit für jeden Zyklus auf 15 - 20 s. Die Luft wird über ein Gebläse am Boden der Wärmekammer verteilt, was eine gleichmäßige Wärmeverteilung innerhalb der Kammer zur Folge hat. Die Temperatur in der Kammer wird über einen Temperatursensor kontrolliert, der in der Nähe der Probenkapillaren installiert ist. Im Fluoreszenzmessgerät dient eine blaue Hochleistungsdiode als Energiequelle zur Anregung der Proben. Das von der Diode abgegebene Licht wird gefiltert und auf dieselbe Wellenlänge (470 nm) gebracht. Der homogene Lichtstrahl wird auf die einzelnen Glaskapillaren, in denen sich die Proben befinden, fokussiert.

Zwei verschiedene Methoden das PCR-Produkt durch Fluoreszenzmessung nachzuweisen sind möglich. Zum einen wird ein Fluoreszin, SYBR-Green, das an Doppelstrang-DNA bindet, verwendet. Diese Methode ist bei der Erkennung von Amplifikaten bei sehr niedrigen Template Konzentrationen (1-100 Templatesequenzen) limitiert. Zum anderen ist die Verwendung von an sequenzspezifische Oligonukleotidsonden gebundenen Fluoreszinen, wie Light-Cycler-Red 640, die eine noch spezifischere Analyse von Amplifikaten erlauben, möglich. Bei dieser Methode hybridisieren zwei Oligonukleotidsonden während des PCR-Annealing Schrittes an aneinander angrenzenden Regionen der Ziel-DNA. Das 5' Oligonukleotid (Donor) ist an seinem 3' Ende, das 3' Oligonukleotid (Akzeptor) an seinem 5' Ende mit einem Fluoreszin markiert. Das Donor-Fluoreszin wird durch externes Licht angeregt und gibt die Anregungsenergie an das Akzeptor-Fluoreszin weiter (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer). Das von dem so angeregten Akzeptor-Fluoreszin emittierte Licht kann dann von dem Fluoreszenzmessgerät quantifiziert werden (Siehe Abbildung 8).

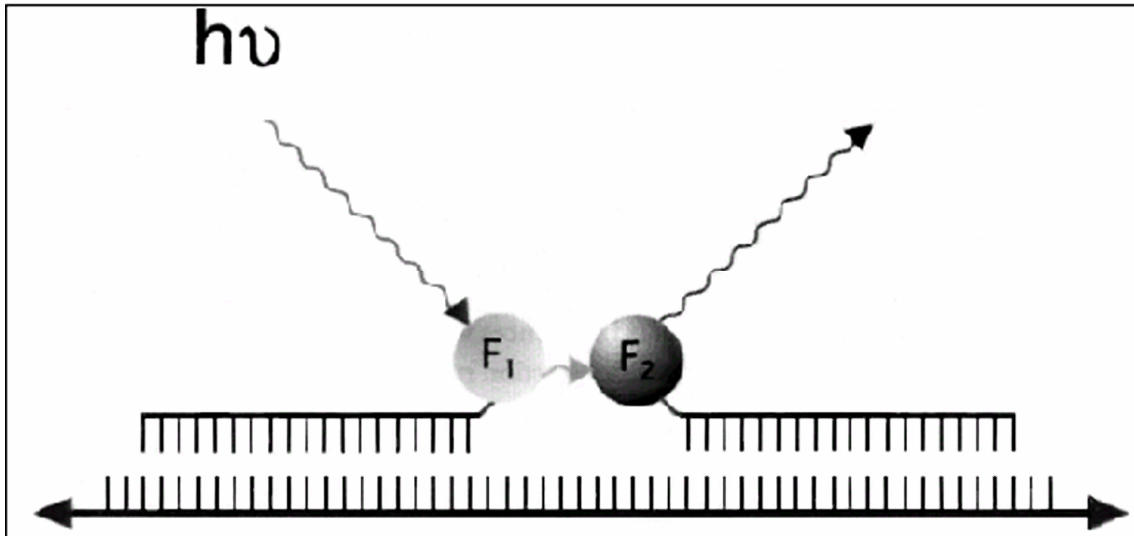


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)

Die Sequenz der Sonden wird nach folgenden Kriterien ausgewählt: Das Vorkommen der vier Basen in der Sonde sollte möglichst gleich verteilt sein. Die Basensequenz sollte weder sich wiederholend noch komplementär sein. Es sollten weder Ansammlungen der Base Guanin, noch Cytosin an den Enden der Sonde vorkommen. Auch extrem purinreiche Sequenzen sollten bei der Wahl geeigneter Sonden vermieden werden. Die zwei Sonden werden in unmittelbarer Nähe zueinander gewählt, ihr Abstand sollte nicht mehr als 5 Basenpaare (10 – 100 Å) betragen. Die Schmelzpunkte der Sonden sollte 5 - 10° C über denen der Primer liegen. Die Sonden sollten nicht mit den Primern hybridisieren und so modifiziert sein, dass sie während der Polymerase-Kettenreaktion keiner Elongation unterliegen.

Geräte und Zubehör

Light-Cycler Software 3.3 (Roche); Light-Cycler Kapillaren (Roche); Light-Cycler Zentrifugenadaptoren mit Kühlblock (Roche); Zentrifuge (Abbott); Abzug (Heraeus Instrumenta); Kühlschrank 2 - 8° C (Genheimer); Kühlschrank -22° C (Genheimer); Vortex (Vortex Genie 2); geeichte Pipetten (Eppendorf); Pipettenspitzen (Eppendorf); 0,2 ml Mikrozentrifugenröhrchen (Perkin Elmer); 2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt)

3.2 Methoden

3.2.1 IFT

3.2.1.1 Testprinzip

Kommerziell verfügbare Test-Kits der Firma MRL-Diagnostics, USA, wurden zur Bestimmung der Serumantikörperreaktivität verwendet. IgM- und IgG-Antikörpertiter wurden getrennt bestimmt. Der MRL-Diagnostics HGE IFT benutzt HGE-1 infizierte HL60 Zellen als Antigene. Für den Nachweis der Babesien wurden zusätzlich Objektträger der Firma Virotech verwendet, die mit Babesien infizierten Erythrozyten beschichtet sind. Der Indirekte Immunfluoreszenz Antikörper (IFA) Test beruht auf einem zweiphasigen Sandwich-Prinzip. Das Patientenserum wird auf den mit HGE-infizierten HL60-Zellen - beziehungsweise auf den mit Babesien infizierten Erythrozyten - beschichteten Feldern der Objektträger inkubiert. Nach einem Waschvorgang, der nicht gebundene Antikörper entfernt, wird in einer zweiten Inkubationsphase ein mit Fluoreszin markierter, gegen humanes IgG/IgM gerichteter Antikörper an den Antigen-Antikörperkomplex gebunden. Nach erneutem Waschen werden die Objektträger mit einem Immunfluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ein positives Testergebnis zeigt sich als apfelgrüne Fluoreszenz (Siehe Abbildungen 9 und 10).

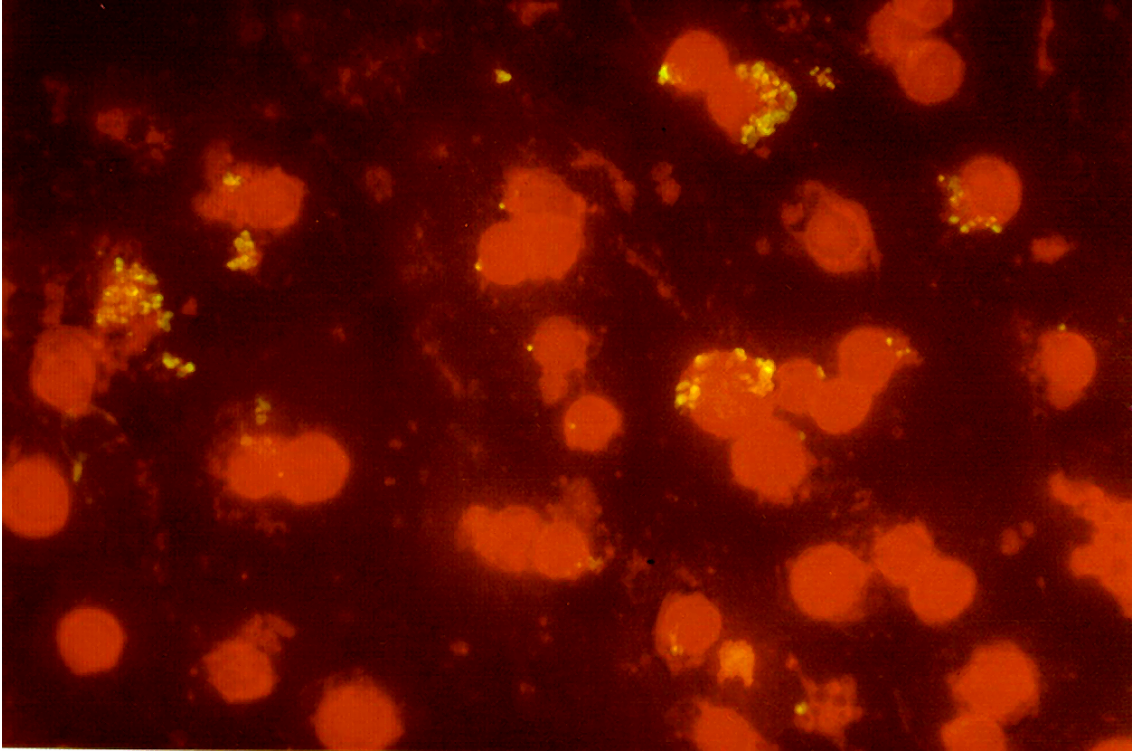


Abbildung 9: HGE-IFT unter dem Fluoreszenzmikroskop bei
400-facher Vergrößerung

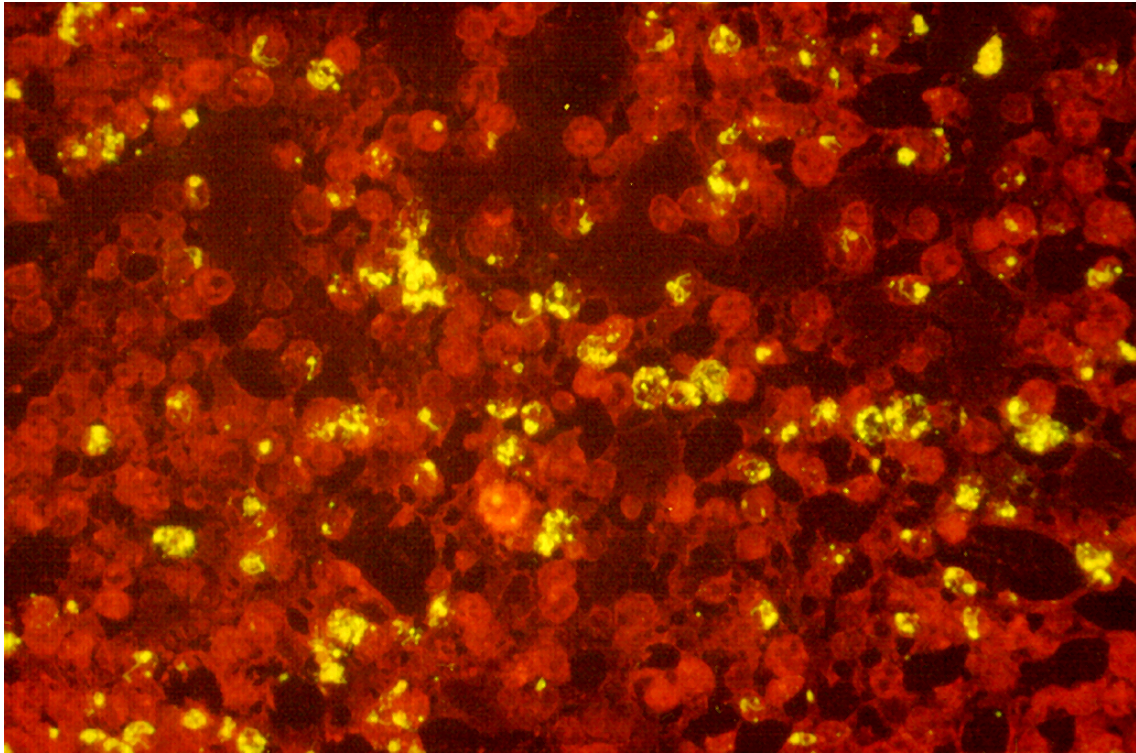


Abbildung 10: Babesien-IFT unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung.

3.2.1.2 IgG/IgM-IFT-Durchführung

Die im Kühlschrank bei 2 - 8° C gelagerten Test-Kits und die bei -22° C eingefrorenen Patientenseren wurden auf Raumtemperatur (15 - 25° C) äquilibriert. Die Verdünnungskonzentration der Seren mit PBS betrug 1:64 zum Nachweis von IgG und 1:20 zum Nachweis von IgM. Im Fall des IgM-Nachweises wurden vor dem Verdünnen des Serums eventuell vorhandene IgG-Antikörper mit dem Pretreatment-Diluent abgetrennt. Auf die Testfelder der Objektträger wurde je 25 µl verdünntes Patientenserum aufgebracht. Bei jedem Test wurden eine Positivkontrolle in drei Verdünnungen mit PBS (1:4, 1:8, 1:16) und eine Negativkontrolle mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit (bei 37° C) von einer halben Stunde bei der IgG-Diagnostik, beziehungsweise einer Stunde bei der IgM-Diagnostik erfolgte ein erster Waschschriff. Dabei wurde jedes Testfeld mit PBS abgespült, die Objektträger in einer mit PBS gefüllten Färbeküvette 10 min schüttelnd gewaschen und danach kurz in destilliertes Wasser getaucht. Man ließ die Felder an der Luft trocknen. Nach Aufbringen von 25 µl IgG- bzw. IgM-Konjugat und einer weiteren 30-minütigen Inkubation bei 37° C erfolgte ein zweiter, dem ersten identischer Waschschriff.

Nach Lufttrocknung wurden die Felder mit dem Eindeckmedium und einem Deckglas bedeckt.

3.2.1.3 IFT-Auswertung

Die Objektträger wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Im Fall von HGE wurden Titer von >1:20 (IgM) und >1:64 (IgG) als positiv bewertet. Beim *Babesia microti*-IFT wurde eine Seroreaktivität von >1:32 (IgG) als positiv angesehen.

Um eine akkurate Testdurchführung zu garantieren, wurden bei jedem Ansatz Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Für die statistische Auswertung der Daten wurde der Chi-Quadrat Test nach Fischer verwendet.

3.2.2 Granulozytenseparation

Für die Isolierung der Granulozyten aus mit Heparin versetztem Vollblut wurden 20 - 30 ml Vollblut langsam auf ein Leukozytenseparationsmedium in einem Bluecap-Röhrchen aufgeschichtet. Man ließ den Gradienten 35 min bei 1700 rpm und 20° C ohne Bremse frei flottieren und saugte bis etwa 1 cm über dem roten Erythrozytenkissen ab. Nach Auffüllen des Ficoll-Röhrchens mit PBS ad 50 ml wurden 5 Minuten lang bei 2000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand bis zu den als rötliche Schicht auf dem Ficoll-Kissen liegenden Granulozyten wurde abgesaugt, der Rest aufgemischt und in eine kalte 50 ml-Flasche gegossen. Nach Schocken mit eiskaltem doppelt destilliertem Wasser und Schwenken der Flasche für 45 - 60 s wurde 3 ml 5 M NaCl-Lösung zugesetzt, gemischt, und für 8 min in 50 ml-Bluecaps bei 900 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Granulozytenpellet wurde in PBS resuspendiert und 5 min bei 900 rpm und 4° C zentrifugiert, der Überstand abgesaugt. Nach zweimaligem Wiederholen des letzten Waschschrilles erfolgte die Auszählung der Granulozyten in der Zählkammer. Es wurden bis zu 10^5 Granulozyten in 200 µl PBS für die DNA-Isolierung verwendet.

Des Weiteren war die Kultivierung in RPM1-Medium mit 10% FCS (fetales Kälberserum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Glutamin (2mM) in einer Konzentration von 1×10^8 pro 50 ml Medium bei 37° C in Zellkulturflaschen möglich.

3.2.3 DNA-Isolierung

Vor Beginn der DNA-Isolierung wurde ein Metallblock-Thermostat auf 56° C temperiert. Auf den Boden eines 1,5 ml-Reaktionsgefäßes wurden 20 µl der Proteinase-K-Stammlösung pipettiert und 5 x 10⁶ Granulozyten in 200 µl PBS sowie 200 µl Buffer AL zugegeben. Nach sofortigem Durchmischen auf dem Vortex (15 s) inkubierte man die Probe für 10 min bei 56° C. Um Kreuzkontaminationen durch Verspritzen von Probenflüssigkeit im Deckelinneren zu vermeiden, wurde das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugiert. Daraufhin gab man 200 µl Ethanol (96 - 100%) zur Probe, mischte für 15 s auf dem Vortex und zentrifugierte kurz ab. Die Mischung wurde auf eine QIAamp Spinsäule in einem 2 ml-Collection-Tube gegeben, der Deckel geschlossen und bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wurde die Spinsäule in ein sauberes 2 ml-Collection-Tube gestellt, 500 µl AW1 Buffer hinzugegeben und 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Man setzte die Spinsäule in ein sauberes 2 ml-Collection-Tube und verwarf das Filtrat. Es wurden 500 µl AW2 Buffer hinzugegeben und 3 min bei maximaler Geschwindigkeit (14.000 rpm) zentrifugiert. Nach wiederholtem Verwerfen des Filtrates und Setzen der Spinsäule in ein sauberes 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 22 µl AL Buffer auf die Spinsäule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert, sowie 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Die dadurch eluierte DNA wurde, wenn die weiteren Arbeitsschritte nicht sofort angeschlossen wurden, bei -22° C eingefroren.

3.2.4 PCR

Die PCR ist eine in vitro Methode, um definierte, erregerspezifische DNA-Sequenzen enzymatisch zu synthetisieren. Zwei Oligonukleotid-Primer hybridisieren mit der nachzuweisenden DNA. Sie flankieren den erregerspezifischen DNA-Abschnitt, der amplifiziert werden soll. Die Reaktion besteht aus der mehrfachen Wiederholung von Zyklen, in denen sich die Schritte Denaturierung des Doppelstranges, Primeranlagerung und Komplettierung des DNA-Stranges durch die thermostabile Taq-Polymerase von den Primern aus, abwechseln. Daraus resultiert die exponentielle Vermehrung des spezifischen DNA-Fragmentes.

3.2.4.1 Nested-PCR/epank1 Gen-PCR

Die bei -22°C gelagerten PCR-Reagenzien - Mastermix, doppelt destilliertes Wasser, Primer, HGE-DNA (Positivkontrolle) und isolierte Patienten DNA - wurden nach dem Auftauen sofort auf Eis gestellt. In ein 2 ml Reaktionsgefäß wurden pro Reaktionsansatz 25 μl Mastermix, 100 pmol je Primer und 23 μl doppeldestilliertes Wasser hineinpipettiert. Davon gab man nach Durchmischen auf dem Vortex je 49 μl in ein Mikrozentrifugenröhrchen. Nach Zugabe von 1 μl isolierter Patienten-DNA wurde gemischt, kurz anzentrifugiert und die PCR-Reaktion gestartet. Jeder Ansatz schloss eine HGE-Erreger positive Kontrolle und zwei Negativkontrollen ein. Ein Drei Stufen Cycling Programm wurde bei Verwendung der Primer Ehr 521/Ehr 747 eingesetzt: Initiale Denaturierung bei 94°C (4 min), 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C (45 s); Annealing bei 60°C (45 s), Verlängerung der Primer bei 72°C (45 s) sowie finale Verlängerung bei 72°C (5 min), um eine vollständige Synthese der Produkte zu gewährleisten.

Das Ergebnis dieser Amplifikation, ein 247 Basenpaare langes Genprodukt, wurde im Sinne einer Nested-PCR mit 100 pmol der Primer Ehr 552/706 unter sonst identischen Bedingungen reamplifiziert. Das dabei entstehende 177 bp internes Genprodukt wird als für die *E. phagocytophila* Gruppe spezifisch bezeichnet (100). Bei allen DNA-Proben wurde außerdem die Amplifizierung des epank1-Gens mit dem Primerpaar LA6/LA1 versucht. Das epank-1 Gen kodiert für ein 153 kDa Protein, das der *E. phagocytophila*/Anaplasma Genogruppe gemeinsam ist (121). Hierbei wurde das Thermocycling mit einer 2-minütigen Denaturierung bei 94°C begonnen, gefolgt von 8 Zyklen je 30 s bei 94°C und 30 s bei 72°C , wobei die Annealing Temperatur während dieser 8 Zyklen alle 2 Zyklen um 2°C , von 62°C auf 56°C herabgesetzt wurde. Danach schlossen sich 28 Zyklen mit einer konstanten Denaturierungstemperatur von 94°C (30 s), Annealingtemperatur von 54°C (30 s) sowie die Verlängerung der Primer bei 72°C (30 s) an. Darauf folgte die finale Verlängerung bei 72°C (5 min).

Um das Risiko einer Kontamination zu minimieren, fand die Amplifikation in einem separaten Raum statt. Es wurden keine falsch-positiven Resultate bei den mitgeführten Negativkontrollen beobachtet. Die Amplifikate wurden in einem mit ethyldibromidversetzten 1,8% Agarose-Gel (0,9 g Agarose/50 ml 1 -mal TAE-Puffer)

sichtbar gemacht. Dazu wurden 10 µl der Amplifikate mit 1 µl Loading-Dye vermischt und je 10 µl dieser Mischung in die Geltasche pipettiert. Ein ebenfalls mit Loading-Dye verdünnter DNA-Längenstandard (10 µl) wurde in die erste Geltasche gegeben. Die Gelelektrophorese zur Auftrennung der Genfragmente lief bei 110 V und 100 mA etwa 45 Minuten. Bei Verwendung der Primer Ehr 521/Ehr 747 resultierte ein Fragment mit etwa 247 Basenpaaren, bei dessen Reamplifizierung ein 117 Basenpaare langes internes Genprodukt. Die Amplifizierung des epank1-Gens mit den Primern LA6/LA1 ergab ein etwa 444 Basenpaare langes Genprodukt.

3.2.4.2 Realtime-PCR

In ein auf Eis gestelltes 2 ml-Reaktionsgefäß wurden für jeden Reaktionsansatz 11,6 µl doppelt destilliertes Wasser, 2,4 µl Magnesiumchlorid, 1 µl je Primer und 2 µl Light-Cycler-FastStart DNA Master SYBR Green I hineinpipettiert. Nach gründlichem Vortexen gab man 18 µl dieser Mischung in jedes 0,2 ml Mikrozentrifugenröhrchen, fügte 2 µl der jeweiligen Patienten-DNA hinzu, und pipettierte 18 µl davon in die in den Adaptern vorgekühlten Light-Cycler Kapillaren. Diese wurden verschlossen und mit den Adaptern 5 s zentrifugiert. Daraufhin wurden die Kapillaren in den Rotor des Light-Cycler Gerätes gestellt. Die Cycling-Parameter wurden wie folgt gewählt: Initiale Aktivierung der Fast-Start Taq DNA Polymerase bei 95° C (10 min), 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung bei 95° C (10 s), Annealing bei 54° C (20 s) sowie Elongation bei 72° C (30 s). Am Ende des Annealings wurde jeweils eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen wurden online visualisiert und mit der speziellen Light-Cycler Software ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 HGE-IFT

Von 490 der auf HGE-spezifische Antikörper getesteten Forstarbeiterseren wiesen 85 (17,3%) Antikörper gegen den Erreger der HGE auf. 30 wurden als eingeschränkt positiv bewertet. Die als spezifischer geltenden IgG-Antikörper wurden in 61 (12,4%) der Seren nachgewiesen. 30 (6,1%) der Seren waren HGE-IgM positiv. Als eingeschränkt IgM positiv sah man 30 (6,1%) der Seren an. In 6 (1,2%) Fällen wurden sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper gefunden. Zwei IgG positive Seren wurden zusätzlich als eingeschränkt IgM positiv bewertet.

18 (21,2%) der HGE-positiven Seren wiesen auch Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* auf. In 15 Fällen (17,6%) handelte es sich dabei um IgG- in 6 Fällen (7,1%) um IgM-Antikörper gegen Borrelien, in 3 Seren (3,5%) waren beide Antikörperklassen vorhanden. Von den HGE-Antikörpern gehörten 12 der IgG-, 7 der IgM-Klasse an. Ein Serum, das auch Antikörper gegen Borrelien aufwies, hatte sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper gegen HGE.

Antikörper gegen Babesien konnten bei 10 (11,8%) der HGE-positiven Seren gefunden werden. Davon waren 6 (7,1%) HGE-IgG- und 8 (9,4%) HGE-IgM-Antikörper. 4 (4,7%) Babesien-IgG positive Seren besaßen sowohl anti-HGE-IgM als auch –IgG.

4.2 Babesien-IFT

Babesien-spezifische IgG-Antikörper konnten in 68 (13,9%) der 490 untersuchten Waldarbeiterseren detektiert werden.

Darunter befanden sich 16 Seren (20,5%) in denen auch Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen wurden. 16 waren Antikörper der IgG-, 4 der IgM-Antikörperklasse, 4 dieser Seren waren beiden Antikörperklassen zuzuordnen.

Antikörper gegen alle drei Erreger fanden sich in zwei der Patientenseren.

4.3 Vergleich

Die immunserologischen Testergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse. Verteilung der Antikörpertiter für HGE und B. microti in verschiedenen Risikokategorien für Zeckenexposition.

<u>Patientenseren</u> n= 753	<u>Anti-HGE</u> positiv	<u>Anti-HGE</u> IgG positiv	<u>Anti-HGE</u> IgM positiv	<u>Anti-HGE</u> IgG und IgM positiv	<u>Anti- Babesia</u> positiv	<u>Antikörper</u> <u>gegen</u> <u>mehr als</u> <u>eine</u> <u>TOBB</u>
Waldarbeiter n= 490	85 (17,3%)	61 (12,4%)	30 (6,1%)	6 (1,2%)	68 (13,9%)	10 (2,0%)
LB-positive n= 78	18 (23,1%)	12 (15,4%)	7 (9,0%)	1 (1,2%)	16 (20,5%)	2 (2,6%)
LB-IgG positiv n= 67	15 (22,4%)	11 (16,4%)	4 (6,0%)	0	16 (23,9%)	1 (1,5%)
LB-IgM positiv n=19	6 (31,6%)	4 (21,1%)	3 (15,8%)	1 (5,3%)	4 (21,1%)	1 (5,3%)
LB-IgG/IgM positiv n= 8	3 (37,5%)	2 (25,0%)	2 (25,0%)	1 (12,5%)	4 (50,0%)	1 (12,5%)
LB-negative n=412	67 (16,3%)	49 (11,9%)	23 (5,6%)	5 (1,2%)	54 (13,1%)	8 (1,94%)
Blutspender n= 263	5 (1,9%)	4 (1,5%)	1 (0,4%)	0	n. d.	n. d.

Das Kollektiv „Blutspender“ wurde mit dem Kollektiv „Waldarbeiter“ in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern gegen Humane Granulozytäre Ehrlichiose mit dem exakten Chi-Quadrat Test nach Fisher verglichen (Siehe Tabelle 5). Dabei wies das

Waldarbeiterkollektiv signifikant öfter Antikörper auf ($p < 0,001$).

Tabelle 5: Kreuztabelle für den Vergleich der Waldarbeiterseren mit den Seren gesunder Blutspender.

			HGE		Gesamt
			positiv	negativ	
Seren	Waldarbeiter	Anzahl % von Seren	85 17,3%	405 82,7%	490 100%
	Blutspender	Anzahl % von Seren	5 1,9%	258 98,1%	263 100%
Gesamt		Anzahl % von Seren	90 12,0%	663 88,0%	753 100%

Bei der Gruppe der Waldarbeiter wurde eine Lyme-Borreliose positive ($n = 78$) und eine Lyme-Borreliose negative ($n = 412$) Untergruppe definiert. Der Vergleich dieser beiden im Bezug auf die Häufigkeit von Antikörpern gegen HGE ergab kein signifikant häufigeres Vorliegen von Antikörpern in einer der beiden Gruppen (Siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Kreuztabelle für den Vergleich Borreliose positiver mit Borreliose negativen Waldarbeiterseren in Bezug auf das Auftreten von Antikörpern gegen den Erreger der HGE

			HGE		Gesamt
			positiv	negativ	
Seren 2	Borreliose positiv	Anzahl % von Seren 2	18 23,1%	60 76,9%	78 100%
	Borreliose negativ	Anzahl % von Seren 2	67 16,3%	345 83,7%	412 100%
Gesamt		Anzahl % von Seren 2	85 17,3%	405 82,7%	490 100%

Dieselben Untergruppen wurden auf die Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern gegen *B. microti* untersucht. Der Vergleich ergab kein signifikant höheres Auftreten von

Antikörpern in der Gruppe der Lyme-Borreliose positiven (n= 78) oder negativen (n=412) Gruppe (Siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Kreuztabelle für den Vergleich Borreliose positiver mit Borreliose negativen Waldarbeiterseren in Bezug auf das Auftreten von Antikörpern gegen *B. microti*.

			Babesiose		Gesamt
			positiv	negativ	
Seren 3	Borreliose positiv	Anzahl % von Seren 3	16 20,5%	62 79,5%	78 100%
	Borreliose negativ	Anzahl % von Seren 3	52 12,6%	360 87,4%	412 100%
Gesamt		Anzahl % von Seren 3	68 13,9%	422 86,1%	490 100%

4.4 PCR

Eine spezifische HGE-DNA-Sequenz konnte in keiner der aus Granulozyten isolierten DNA amplifiziert werden.

5 Diskussion

5.1 Vergleich mit den Ergebnissen anderer Publikationen

In den letzten Jahren mehren sich mit dem zunehmenden Bekanntheitsgrad der durch Zecken übertragenen Erkrankungen auch die Studien zu diesem Thema. Mehrere Risikogruppen wie Waldarbeiter, Camper, Bewohner ländlicher Gegenden sowie Lyme-Borreliose-Patienten wurden von Arbeitsgruppen im In- und Ausland untersucht (51, 60, 61, 62, 63, 64, 70, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 132).

5.1.1 HGE-IFT

Die ersten seroepidemiologischen Untersuchungen über HGE-Infektionen in Europa wurden 1995 in der Schweiz (61) und in Großbritannien (64) durchgeführt. In diesen und anderen inzwischen vorliegenden Studien zeigen sich Serumantikörperprävalenzen von 0% - 2% bei Blutspendern und 1,4% - 28% bei Zecken exponierten Risikokollektiven. In der Mehrzahl der Studien wurde ein IFT zum Nachweis der Antikörper eingesetzt.

Es wurde anfangs angenommen, die Vergleichbarkeit der einzelnen Studien werde durch die Verwendung verschiedener Antigene erschwert. So kamen bei älteren Studien *E. equi* oder *E. phagocytophila* als Antigene zum Einsatz, wogegen neuere Studien in HL-60-Leukämiezelllinien kultivierte HGE-Erreger als Antigen verwendeten. Diskrepanzen bei Antikörpertitern und Sensitivität wurden aufgrund dieser Tatsache beschrieben (101, 102). Andererseits spricht die - unter anderem von Chen (5) gezeigte - 99,9% -ige Homologie der Humanen Granulozytären Ehrlichiose mit *E. equi* und *E. phagocytophila* für eine Vergleichbarkeit der Studien, die eines der drei Antigene verwenden. Die 1995 von Dumler et al. gezeigte signifikante Kreuzreaktivität im IFT und Immunoblot bestärkt ebenfalls die Überlegungen, es handele sich bei *E. equi*, *E. phagocytophila* und dem HGE-Erreger um eine sehr nahe verwandte oder identische Spezies (101). Seit der neuen Klassifizierung im Jahr 2001 werden *E. equi* und der HGE-Erreger als Synonyme für *Anaplasma* (ehemals *Ehrlichia*) *phagocytophila* angesehen (127).

In einer der ersten europäischen Ehrlichien IFT-Studien, 1995 in der Schweiz, wiesen von 70 getesteten LB-positiven Seren 12 (17,1%) Antikörper auf. Die Studie verwendete *E. equi* als Antigen (61). Keiner der Blutspender des Vergleichskollektivs wurde als positiv befunden.

Sumption et al. (64) ermittelten bei ihrer 1995 durchgeführten IFT-Studie in Großbritannien Antikörperprävalenzen von 7,5% bei 40 LB-Patienten sowie von 5% bei 40 zeckenexponierten Personen. Keiner der 40 untersuchten Blutspender hatte Antikörper im Serum. Als Antigen wurde *E. phagocytophila* verwendet.

In der Seroprävalenzstudie in Norwegen (1996) von Bakken et al. fanden sich bei 58 Patienten mit Lyme-Borreliose in 10,3% Antikörper gegen *E. equi* (60).

Im Jahr 1997 veröffentlichte Dumler eine seroepidemiologische Studie zu HGE in Schweden, ebenfalls unter Verwendung von *E. equi*-Antigenen (62). Von den 185 mit IFT getesteten Bewohnern einer Insel wiesen 21 (11,4%) Antikörper gegen *E. equi*, 25 (13,5%) Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* auf. Damit lag die Antikörperprävalenz für beide Erreger - wie in der vorliegenden Studie - etwa gleich hoch.

Die Arbeitsgruppe um Fingerle ermittelte 1997 die Antikörperprävalenz bei einem Forstarbeiterkollektiv sowie bei Patienten mit Lyme-Borreliose in Süddeutschland (51). Dabei konnten - unter dieser Studie sehr ähnlichen Testbedingungen - unter Verwendung von HGE-infizierten HL60-Zellen als Antigene bei 21 von 150 (14,0%) Forstarbeitern Antikörper gegen HGE gefunden werden. Von diesen wiesen 18 Seren (12%) Antikörper der IgG-, 2 Seren (1,3%) Antikörper der IgM-Klasse auf. In einem Serum (0,7%) konnten beide Antikörperklassen gefunden werden. Der Test auf Antikörper gegen Lyme-Borreliose ergab ein positives Ergebnis bei 80 der 150 (53,3%) Forstarbeiterseren. Im Vergleich dazu hatten nur 12 der 105 (11,4%) untersuchten Lyme-Borreliose Patienten HGE-Antikörper im Serum. Im Vergleichskollektiv der Blutspender wiesen nur 2 der 103 (1,9%) untersuchten Seren eine Antikörperreaktivität auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind mit 17,3% HGE-positiver Waldarbeiter, (12,4% IgG, 6,1% IgM sowie 1,2% beide Antikörperklassen), den Ergebnissen der Studie von Fingerle et al. im Bezug auf HGE sehr ähnlich, obwohl deutlich weniger der Seren als Borreliose positiv bewertet wurden als in der oben genannten Studie (13,6% im Vergleich zu 53,3% in der Arbeitsgruppe um Fingerle).

Im Jahr 1998, bei einer von Pusterla et al. mit *E. phagocytophila* als Antigen durchgeführten IFT-Studie, waren in einer Risikogruppe 23 von 258 Schweizer Jägern (8,9%) HGE-positiv (103). Im Vergleich dazu wiesen 19 von 149 Lyme-Borreliose

Patienten (12,8%) Antikörper gegen *E. phagocytophila* auf. Damit lag die Antikörperprävalenz in beiden Risikogruppen signifikant höher als im Vergleichskollektiv gesunder Blutspender (n= 530) mit 1,1% positiven Seren.

Bei der Untersuchung von 132 Neuroborreliosepatienten in Dänemark im Jahr 1998 fanden sich nur 3,8% HGE-positive Seren unter Verwendung von Antigenen aus der *E. phagocytophila* Genogruppe (*E. equi*) (63). Dagegen liegt die Seroprävalenz mit 23% bei 300 untersuchten Patienten mit positiver Lyme-Borreliose Serologie in der Publikation von Skarphedinsson et al. (2001) deutlich näher an den Ergebnissen der vorliegenden Studie (104).

Die Untersuchung der Seroprävalenz von anti-HGE-Antikörpern in einem Kollektiv von Patienten mit Lyme-Borreliose in Deutschland ergab in der Studie von Hunfeld et al. 1998 signifikant höhere Antikörpertiter als in der Kontrollgruppe (70). Die Arbeitsgruppe verwendete HGE-Antigene aus HL60-Zellen und arbeitete mit den kommerziell vertriebenen Kits der Firma MRL-Diagnostics. Es fanden sich bei 13 der 120 (10,8%) untersuchten Patienten mit Lyme-Borreliose auch Antikörper gegen HGE, in der Gruppe der Blutspender nur bei einem von 100 (1%).

In der Studie von Thomas et al. (1998) über das Vorkommen von HGE -Antikörpern bei 404 Landarbeitern in England wurden sehr niedrige Zahlen für das Vorkommen der Lyme-Borreliose (0,2%) und HGE (1,5%) festgestellt (105). Dabei ist besonders bemerkenswert, dass die Prävalenz der HGE höher lag als die der Lyme-Borreliose.

Nuti et al. ermittelten bei einer IFT-Studie 1998 in Italien die Antikörperreaktivität gegen *E. phagocytophila* bei verschiedenen Risikogruppen (106). In der Gruppe der Waldarbeiter wiesen 21 der 242 Getesteten (8,6%) Antikörper auf. Sechs der 109 getesteten Jäger (5,5%) und drei der 193 Kontrollpersonen (1,5%) hatten Antikörper gegen *E. phagocytophila* in ihren Seren.

Bei einer Immunfluoreszenzuntersuchung im Jahr 1999 in Bulgarien, mit dem HGE-Erreger als Antigen, fanden sich bei 18 von 200 (9,0%) zeckenexponierten Personen Antikörper gegen HGE (107). Die höchste Antikörperprävalenz fand sich mit 20% in der Untergruppe der Patienten mit Fieber, Husten und Kopfschmerzen nach Zeckenstich und in der Untergruppe mit Erythema migrans (9,7%). Bei einem Vergleichskollektiv

gesunder Blutspender lagen bei 2,9% der 70 getesteten Personen HGE-Antikörper vor.

Die Bestimmung der Seroprävalenz für Ehrlichiose und Lyme-Borreliose bei Kindern und jungen Erwachsenen in Slowenien durch Cizman et al. im Jahr 2000 ergab das gleiche Ergebnis für beide von Zecken übertragenen Krankheiten (108). Von 143 untersuchten Seren wiesen 22 (15,4%) HGE und 22 (15,4%) *Borrelia burgdorferi*-spezifische Antikörper auf. Die Ergebnisse sind dafür, dass es sich um keine besonders zeckenexponierte Bevölkerungsgruppe handelte, erstaunlich hoch.

In der in Schweden von Wittesjo et al. durchgeführten Studie ergab sich in einem Zeitraum von zwei Jahren ein signifikantes Ansteigen der Seroprävalenz bei der Untersuchung von 290 Bewohnern eines Zeckenendemiegebietes mit *E. equi* als Antigen im IFT (109). Nach dem Jahr 1994 wurden 28% als seropositiv bewertet. Die Inzidenzraten lagen bei 3,9% sowie 11,1%.

Bei einer in Nordspanien von Oteo et al. durchgeführten IFT-Studie fanden sich in einem Kollektiv aus Waldarbeitern, LB-Patienten und Personen mit Zeckenbiss in der Anamnese bei 2 von 147 Personen (1,4%) Antikörper gegen HGE (110).

Woessner et al. fanden bei einer IFT-Untersuchung in Deutschland bei 361 männlichen Soldaten in 14,9% HGE-Antikörper zu Beginn der Studie (111). Es wurde der IFT von MRL-Diagnostics (HGE als Antigen) verwendet. Weitere 19 (5,3%) serokonvertierten von IgG negativ zu positiv im Laufe ihres 10-monatigen Militärdienstes. 19 (5,3%) der 361 Männer wiesen Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* auf.

In Belgien testeten Guillaume et al. LB-Patienten auf HGE-Antikörper. 16 (7,4%) der 216 Seren wurden im IFT als positiv beurteilt (132).

Tabelle 7 gibt einen Überblick der europäischen Publikationen zu den Seroprävalenzen bei unterschiedlichen Risikopopulationen.

Tabelle 8: Vergleich der europäischen Publikationen zur Antikörpertiterverteilung bei unterschiedlichen Risikogruppen in Bezug auf deren Zeckenexposition.

<u>Studie</u>	<u>Kollektiv</u>	<u>Antigen des IFT</u>	<u>HGE-positiv</u>	<u>LB-positiv</u>
Broqui et al. (1995)	LB-Patienten n=70	E. equi	12 (17,1%)	70 (100%)
Sumption et al. (1995)	LB-Patienten n= 40	E. phago- zytophila	3 (7,5%)	40 (100%)
	Zeckenexponiert n= 40		2 (5,0%)	n.d.
Bakken et al. (1996)	LB-Patienten n=58	E. equi	6 (10,3%)	58 (100%)
Dumler et al. (1997)	Inselbewohner n= 185	E. equi	21 (11,4%)	25 (13,5%)
Fingerle et al. (1997)	Waldarbeiter n= 150	HGE	21 (14,0%)	80 (53,3%)
	LB-Patienten n=105		12 (11,4%)	105 (100%)
Lebech et al. (1998)	Neuroborreliose- Patienten n= 132	E. equi	5 (3,8%)	132 (100%)
Hunfeld et al. (1998)	LB-Patienten n=120	HGE	13 (10,8%)	120 (100%)
Thomas et al. (1998)	Landarbeiter n= 518	HGE	8 (1,5%)	1 (0,2%)

<u>Studie</u>	<u>Kollektiv</u>	<u>Antigen des IFT</u>	<u>HGE-positiv</u>	<u>LB-positiv</u>
Nuti et al. (1998)	Waldarbeiter n= 242 Jäger n= 109	E. phago- zytophila	21 (8,6%) 6 (5,5%)	n.d.
Pusterla et al. (1998)	Jäger n= 258 LB-Patienten n=149	E. phago- zytophila	23 (8,9%) 19 (12,8%)	n.d. 149 (100%)
Christova et al. (1999)	LB-Patienten n=145 Zeckenexponiert n= 200	HGE	14 (9,7%) 18 (9%)	145 (100%) 145 (72,5%)
Cizman et al. (2000)	Kinder und Jugendliche in Slowenien n= 143	HGE	22 (15,4%)	22 (15,4%)
Wittesjo et al. (2001)	Bewohner eines Zeckenendemie- gebietes n= 290	E. equi	81 (28%)	n. d.
Woessner et al. (2001)	Soldaten n= 361	HGE	54 (14,9%)	19 (5,3%)

<u>Studie</u>	<u>Kollektiv</u>	<u>Antigen des IFT</u>	<u>HGE-positiv</u>	<u>LB-positiv</u>
Oteo et al. (2001)	LB-Patienten n=147	HGE	2 (1,4%)	n.d.
Skarphedinsson et al. (2001)	LB-Patienten n=300	HGE	69 (23%)	300 (100%)
Guillaume et al. (2002)	LB-Patienten n=216	HGE	16 (7,4%)	216 (100%)

5.1.2 Babesiose-IFT

In Europa liegen bislang sehr wenige Untersuchungen zur Antikörperprävalenz gegen *B. microti* vor. Nach den Angaben verschiedener Autoren ist der Erreger endemisch in Zecken und Nagern in Süddeutschland anzutreffen. Es gibt aber im Gegensatz zu *B. divergens*, wo etwa 25 klinische Fälle bei splenektomierten Personen in Europa - hauptsächlich in Großbritannien und Frankreich - beschrieben sind (8), so gut wie keine Angaben über menschliche Infektionen mit *B. microti* in Europa.

In einer der ersten Studien zur Seroprävalenz von *B. microti* in Deutschland untersuchten Hunfeld et al. 1998 die Seren von 120 Lyme-Borreliose Patienten (70). Es fanden sich bei 13 (10,8%) getesteten Personen entsprechende Antikörper. Damit lag die Seroprävalenz für Antikörper gegen *Babesia microti* ebenso hoch wie die in derselben Studie für HGE gefundenen (10,8%) Seroprävalenzen. In der vorliegenden Arbeit liegt die Rate an *B. microti*-Antikörpern mit 13,3% gegenüber der Nachweishäufigkeit von HGE-Antikörpern mit 17,3% etwas niedriger. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass in dieser Studie nur auf IgG-Antikörper, und nicht getrennt Immunglobin-klassenspezifisch getestet wurde.

Magnarelli et al. untersuchten im Jahr 1995 LB-Patienten aus Connecticut und Minnesota auf Antikörper gegen *E. chaffeensis*, *E. equi* und *B. microti* (112). In drei (5,5%) der 55 LB-positiven Seren fanden sich Antikörper gegen *B. microti*. Keines der 6 Kontrollseren hatte Antikörper gegen *B. microti*, *E. chaffeensis* oder *E. equi*.

Eine 1996 von Mitchell et al. durchgeführte IFT-Studie zu Infektionen mit von Zecken übertragenen Erregern ergab bei 96 LB-Patienten in 5 (5,2%) Fällen auch Antikörper gegen HGE und in zwei (2,1%) Fällen auch Antikörper gegen *B. microti* (113). In zwei (2,1%) LB-positiven Seren waren sowohl HGE- als auch *B. microti*-Antikörper vorhanden. Ein HGE- positiver Patient hatte auch Antikörper gegen *B. microti*.

In einer Studie in den USA im Jahr 1999 fanden Fritz et al. bei einem semiruralen Bevölkerungskollektiv (n=230) in Kalifornien 17,8% Antikörper gegen Babesien der WA-1 Spezies, 1,3% Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* und 0,4% Antikörper gegen *E. equi* (114). 51 der 230 untersuchten Personen (23%) hatten Antikörper gegen eine oder mehrere von Zecken übertragene Krankheiten.

In der Schweiz konnten in 1,5% der 396 untersuchten Seren gesunder Blutspender Antikörper gegen *B. microti* gefunden werden (133). In derselben Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Ixodes ricinus*- Nymphen als potente Vektoren für *B. microti* anzusehen sind.

Diese Daten sprechen, wie die hohen Antikörperprävalenzen der vorliegenden Studie dafür, dass *B. microti* in Deutschland eine wesentlich größere Rolle spielt, als bisher angenommen wurde. Das Fehlen von akut Erkrankter mag auf die geringere Virulenz der europäischen *B. microti*- Arten im Vergleich zu den nordamerikanischen Arten liegen, oder aber daran, dass die Krankheitsbilder wegen ihrer unspezifischen Symptome nicht erkannt werden.

Einen Überblick über europäische und außereuropäische Studien zu *B. microti* gibt Tabelle 9.

Tabelle 9: Vergleich europäischer und außereuropäischer Studien zur Antikörpertiterverteilung bei unterschiedlichen Risikogruppen in Bezug auf deren Zeckenexposition.

<u>Studie</u>	<u>Kollektiv</u>	<u>Antigen des IFT</u>	<u>Anti-B. positiv</u>	<u>Anti-LB positiv</u>
Magnarelli et al. (1995)	LB-Patienten n=55	B. microti	3 (5,5%)	55 (100%)
Mitchell et al. (1996)	LB-Patienten n=96	B. microti	2 (2,1%)	96 (100%)
Hunfeld et al. (1998)	LB-Patienten n=120	B. microti	13 (10,8%)	120 (100%)
Fritz et al. (1999)	Semirurale Bevölkerung n= 230	WA-1	41 (17,8%)	3 (1,3)
Foppa et al. (2002)	Blutspender n= 396	B. microti	6 (1,5%)	n.d.

5.1.3 PCR

Den ersten Fall einer durch PCR bestätigten Humanen Granulozytären Ehrlichiose in Europa beschrieben Petrovec et al. 1997 in Slowenien (115). Die Erythrozyten des zur DNA-Extraktion verwendeten Vollblutes wurden durch Zugabe eines Lysing-buffers (320 mM Sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl₂ und 1% Triton X-100) zerstört, das Lysat 5 min zentrifugiert, und das Leukozytenpellet mit PBS resuspendiert. Die DNA Isolation wurde wie in unserer Arbeit mit einem QIAamp-Kit durchgeführt. Es wurden 10 µl als Template bei einem Reaktionsvolumen von 100 µl pro PCR-Ansatz verwendet. Als Primer kamen ge9f und ge10r zum Einsatz, die ein 919 Basenpaare langes Genprodukt amplifizieren. Ob dies ein Zufallsbefund ist oder ob diese Methoden den in dieser Arbeit verwendeten Methoden beim PCR-Nachweis des HGE-Erregers überlegen sind, muss

wegen der geringen Fallzahlen dahingestellt bleiben.

Lebech et al. scheiterten 1998 bei dem Versuch, den HGE-Erreger aus den Seren extrahierter DNA durch PCR nachzuweisen (63). Alle fünf für *E. equi* seropositive Patienten waren PCR-negativ. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Erreger vornehmlich in den Granulozyten aufhalten, erscheint das Gelingen des Erregernachweises aus Serum weit unwahrscheinlicher, als aus Vollblut, oder, wie im Fall der vorliegenden Studie, aus aus Vollblut isolierten Granulozyten. In einer Veröffentlichung von Comer et al. aus dem Jahr 1999 gelang der PCR-Nachweis von HGE aus Serum (116). Damit propagiert die Studie den Nachweisversuch aus Akute-Phase-Serum, falls Vollblut nicht verfügbar ist.

Lotrié-Furlan et al. veröffentlichten 1998 die Bestätigung der Diagnose einer akuten HGE-Infektion mit PCR bei 3 Patienten in Slowenien (117). Die PCR wurde mit den ge9f/ge10r Primern und als Nested-PCR mit den Primern HS1/HS6 und HS43/HS45 unter Amplifizierung des groESL heat shock operons durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose durch PCR hatte noch keiner der Patienten Antikörper gegen HGE im Serum. Im Verlauf wurde bei allen Patienten eine Serokonversion mit hohen Antikörpertitern beschrieben.

Bei einem 54-jährigen Patienten aus den Niederlanden konnte der HGE-Erreger von Van Dobbenburgh et al. 1999 aus peripherem Blut nachgewiesen werden (118).

Tylewska-Wierzbanowska et al. berichteten 2001 die ersten zwei durch PCR bestätigten HGE-Fälle aus Polen (119).

Vor kurzem konnten HGE-spezifische Gensequenzen durch PCR bei einem an HGE erkrankten Pferd in Deutschland nachgewiesen werden (129).

5.2 Wertigkeit der Methoden

Im Gegensatz zur etablierten Labordiagnostik bei Lyme-Borreliose und RMSF ist die Labordiagnostik im Fall von HGE und Babesiose noch nicht einheitlich standardisiert und bedarf weiterer Überarbeitung. Alle diagnostischen Tests für HGE haben ihre Grenzen; die Kultivierung des Erregers ist schwierig und sehr zeitaufwendig, die Detektion der Morulae im Blutausstrich ist nicht sehr sensitiv und der IFT kann nur bei bestätigter Serokonversion und entsprechend hohen Antikörpertitern zur Diagnose einer akuten

Infektion verwendet werden. Die PCR ist die Methode der Wahl für den Nachweis der aktiven Infektion. Die gegenwärtig beschriebenen Methoden sind aber sehr uneinheitlich und bedürfen, auch wegen der noch geringen klinischen Sensitivität (85) der Verbesserung und Vereinheitlichung.

5.2.4 HGE-IFT

Der IFT hat sich als Methode zum Antikörpernachweis bei Humaner Granulozytärer Ehrlichiose als spezifisch und sensitiv erwiesen. Die Sensitivität wird bei Verwendung von HGE-Antigenen aus HLA 60-Zellen mit 82% - 100%, die Spezifität mit 91% - 100% angegeben (102). Da sich diese Angaben auf in den USA gewonnene Daten beziehen, sind dennoch Spezifitäts- und Sensitivitätsprüfungen des IFT an europäischen, durch PCR- oder Kultur bestätigten positiven Fällen notwendig. Als limitierende Faktoren können falsch-positive IFT-Ergebnisse, als Folge von serologischen Kreuzreaktionen, bei Patienten mit Epstein-Barr-Virusinfektion oder Autoimmunerkrankungen vorkommen. Entsprechend verschiedener Publikationen aus den USA stellen Borreliose-Kreuzreaktionen kein Problem dar (112). Dies ist aber aufgrund der unterschiedlichen Genotypen der Borrelien in Nordamerika und Europa nicht uneingeschränkt übertragbar. Die Möglichkeit einer falsch positiven LB-Serologie bei aktiver HGE wird bei Verwendung von ELISA und Immunoblot diskutiert (120). Nach den Untersuchungen von Hunfeld (70) und Fingerle (51) sind dennoch keine Kreuzreaktionen bei Infektion mit *Borrelia burgdorferi* zu erwarten. Ein weiterer limitierender Faktor der Methode ist die Variationsbreite der Beurteilung der Fluoreszenz durch verschiedene Untersucher. Um diese zu minimieren, wurden alle Objektträger in der vorliegenden Arbeit von derselben Person beurteilt.

5.2.5 Babesien-IFT

Gemäß der Evaluationsuntersuchung von Krause et al. (1997) über die Effektivität einer Immunfluoreszenzuntersuchung bei der Diagnosestellung einer *Babesia microti*-Infektion weist diese Untersuchung eine hohe Sensitivität (91%) und Spezifität (99%) auf (35). So kann der Nachweis von IgM Antikörpern im Fall von *B. microti* zur Diagnosestellung einer akuten Infektion wegweisend sein. Der IFT für *B. microti* ist jedoch der einzige IFT, der den Menschen infizierenden *Babesia* spp. bei dem ein Nachweis über Sensitivität und Spezifität vorliegt (10). Bei einer Infektion mit *B. divergens* ist der Antikörpernachweis

hauptsächlich von retrospektiver Bedeutung, da die ersten Antikörper erst 7 bis 10 Tage nach der Hämoglobinurie auftreten (8). In der vorliegenden Arbeit wurden mit *B. microti* als Antigen im IFT gearbeitet. Die in Europa vorherrschende *Babesia* spp. ist jedoch *B. divergens*, die wie der HGE- Erreger und *B. burgdorferi* von *Ixodes ricinus* Zecken übertragen wird. Infektionen von *Ixodes ricinus* mit *B. microti* scheinen aber sehr viel häufiger zu sein als noch vor kurzem angenommen (133). Hunfeld et al. (70) und Foppa et al. (133) verwendeten 1998 und 2002 *B. microti* erfolgreich als Antigen bei seroepidemiologischen Studien zur Humanen Babesiose in Deutschland und in der Schweiz. Die hohen Antikörperprävalenzen der vorliegenden Studie sprechen ebenfalls dafür, dass *B. microti* in Europa eine wichtigere Rolle spielt, als bisher angenommen wurde. Für eine Kreuzreaktivität zwischen Babesien, Borrelien und Ehrlichia Spezies konnte in der Untersuchung von Krause et al. (121) keine Evidenz gefunden werden.

5.2.6 PCR

Es gibt in Europa keine standardisierte Methode zum Nachweis von PCR-amplifizierter HGE-DNA aus Patientenblut. Die in den Niederlanden, Polen (119), Slowenien (115, 117, 126), Schweden (118) und Holland (125) erfolgreich angewandten Methoden unterscheiden sich bei der Wahl des DNA-Isolierungsverfahrens und der Wahl der Primer. Im Moment ist kein optimaler Algorithmus für die Laborbestätigung der Humanen Ehrlichiose etabliert. Die sich bei der Untersuchung von Horowitz et al. (85) zeigte enttäuschende klinische Sensibilität wird nach Walls et al. durch die Verwendung der epank1-Primer signifikant angehoben (122). Dennoch werden Variationen in den epank1 Gensequenzen zwischen den verschiedenen *E. phagocytophila* Linien als Grund für falsch negative Resultate bei Patienten in den USA beschrieben (122). Da diese Variationen zwischen den europäischen *E. phagocytophila*-Linien und den Nordamerikanischen Linien noch weitaus größer sein können, bleibt zu untersuchen, ob sich unter Verwendung des epank1-Gens die Sensitivität der PCR-Diagnostik bei europäischen Patienten mit HGE verbessern lässt.

Die Vorteile der Realtime-PCR im Vergleich mit der konventionellen PCR sind die Zeitersparnis, durch kürzere Cyclingzeit und fehlende Elektrophorese, und das geringere Risiko einer Kontamination durch Reduzierung der Zahl der Handlungsschritte aufgrund der unkomplizierten Analyse der Ergebnisse. Die Sensitivität und Spezifität der beiden Methoden werden als identisch bewertet (123).

6 Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Krankheiten wird durch Zecken auf den Menschen übertragen. Viren (FSME), Bakterien (Borrelien, Rickettsien, Ehrlichia/Anaplasma/Neorickettsia spp.) und Protozoen (Babesien) spielen endemisch in Deutschland eine Rolle. Darunter gewinnen die Humane Granulozytäre Ehrlichiose (HGE) und die Humane Babesiose zunehmend an Bedeutung. Ehrlichiosen und Babesiosen zählen zu den neu aufgetretenen Infektionskrankheiten (emerging infectious diseases). Emerging diseases sind definiert als “new, re-emerging, or drug resistant infections whose incidence in human has increased within the past two decades or whose incidence threatens to increase in the near future” (128).

Humane Ehrlichiosen sind unspezifische, fieberhafte, mit Leukozytopenie assoziierte Erkrankungen, die einige Tage nach einem Zeckenstich auftreten und die durch kleine, obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterien hervorgerufen werden. Der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose, *Anaplasma phagocytophilum*, vermehrt sich als intrazelluläres Einschlusskörperchen in neutrophilen Granulozyten. Die Ausprägung der klinischen Symptome reicht von einer asymptomatischen Serokonversion über einen milden, selbstlimitierenden Verlauf bis zu schweren Krankheitsfällen mit Todesfolge. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt in Europa durch Zecken der Gattung *Ixodes* (*Ixodes ricinus*), die die häufigste Zeckenart in Deutschland darstellt. *Ixodes*- Zecken sind auch die Hauptüberträger der Lyme- Borreliose. Reservoir sind unter anderem Mäusearten wie *Peromyscus leucopus* (Weißfußmaus) und Weißschwanzhirsche. Die Diagnosestellung kann im akuten Krankheitsstadium durch den Nachweis von Mikrokolonien (Morulae) in Granulozyten in einem peripheren Blutaussstrich erfolgen (Giemsafärbung). Weitere diagnostische Möglichkeiten stellen PCR, Anzucht der Erreger in Zellkultur sowie serologische Nachweisverfahren (IFT, ELISA) dar.

Die Humane Babesiose ähnelt in ihrer klinischen Präsentation der Malaria. Die akut fieberhafte Erkrankung geht oft mit Myalgien und einer hämolytischen Anämie einher. Sowohl milde als auch schwere Krankheitsausprägungen sind beschrieben, letztere vor allem bei immunsupprimierten oder splenektomierten Patienten. Babesien sind - wie die Erreger der Malaria - Protozoen und intrazellulär in Erythrozyten zu finden. Babesiose kann durch die Untersuchung peripherer Blutaussstriche (Giemsafärbung) auf intraerythrozytäre Parasiten, PCR oder Serologie diagnostiziert werden. Als Überträger

und Reservoir der *Babesia* spp. gelten Ixodes Zecken. Der Hauptvektor der Humanen Babesiose in Europa ist *Ixodes ricinus*.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Risikokollektiv von 490 Waldarbeitern aus Süddeutschland (Großraum München) mittels IFT auf die Seroprävalenz von Antikörpern gegen die Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose und Babesiose untersucht. Die Seren der Waldarbeiter wurden im Vorfeld durch ELISA, IFT und WB getrennt auf IgG- und IgM-Antikörper gegen *B. burgdorferi* überprüft. Als Kontrollgruppe standen 263 gesunde Blutspender zur Verfügung, die in einer dieser Arbeit vorhergehenden Studie auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* und den Erreger der HGE untersucht worden waren.

Von 490 der getesteten Seren wiesen 85 (17,3%) Antikörper gegen *A. phagocytophila* auf. 61 (12,4%) gehörten der IgG-, 30 (6,1%) der IgM-Klasse an. In 6 Seren wurden sowohl IgM-, als auch IgG-Antikörper gegen den HGE-Erreger nachgewiesen. Antikörper gegen *B. burgdorferi* wiesen 18 (21,2%) der HGE-positiven Seren auf. Antikörper gegen Babesien konnten bei 10 (11,8%) der HGE-positiven Seren gefunden werden. Antikörper gegen alle drei Erreger fanden sich in 2 der Patientenseren.

Antikörper gegen *B. microti* konnten in 68 (13,9%) der 490 Waldarbeiterseren nachgewiesen werden. Davon hatten 16 (20,5%) auch Antikörper gegen *B. burgdorferi*.

Das Kollektiv „Blutspender“ und das Kollektiv „Waldarbeiter“ wurden in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern gegen Humane Granulozytäre Ehrlichiose mit dem exakten Chi-Quadrat Test nach Fisher verglichen. Dabei wies das Waldarbeiterkollektiv signifikant häufiger Antikörper auf ($p < 0,001$).

In der Gruppe der Waldarbeiter ($n = 490$) wurde eine Lyme-Borreliose positive ($n = 78$) und eine Lyme-Borreliose negative ($n = 412$) Untergruppe definiert und diese auf das Auftreten von Antikörpern gegen *A. phagocytophila* und *B. microti* untersucht. Der Vergleich ergab kein signifikant häufigeres Vorliegen von Antikörpern in einer der beiden Gruppen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde versucht, den Erreger der HGE bei 10 Patienten mit

akut fieberhafter Erkrankung nach Zeckenstich und nachgewiesenen IgM-Antikörpern gegen *B. burgdorferi* oder *A. phagocytophila* durch nested- und epank1Gen-PCR, sowie durch Realtime-PCR (Light-Cycler) aus heparinisiertem Vollblut nachzuweisen. Eine HGE spezifische DNA-Sequenz konnte aus keiner der aus den Granulozyten isolierten DNA-Proben nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Bevölkerungsgruppen in Süddeutschland, die vermehrt Zeckenbissen ausgesetzt sind, Risikokollektive für HGE und Babesiose darstellen. Die hohe Prävalenz von HGE und Babesiose in der untersuchten Risikogruppe verdeutlicht die Wichtigkeit, die Erreger in die Differentialdiagnose fieberhafter Erkrankungen nach Zeckenstich aufzunehmen. Ehrlichiosen oder Babesiosen könnten auch die Erklärung für „seronegative Lyme-Borreliose“ sein, da beide Erreger durch die gebräuchlichen diagnostischen Maßnahmen nicht erfasst werden. Auch eine Koinfektion mit HGE sollte bei Lyme-Borreliose, die auf die Therapie mit β -Laktamantibiotika nicht anspricht, gedacht werden. Da Lyme-Borreliose, Babesiose und HGE in Europa vom gleichen Vektor übertragen werden, sind Koinfektionen mit mehr als einem der Erreger nicht selten. Im Fall der Babesiose kommt auch bei einer Malaria, die auf die übliche Medikation nicht anspricht, die differentialdiagnostische Überlegung einer Babesiose in Frage.

Vergleichbare IFT-Studien in Europa zeigen ähnliche Serumantikörperprävalenzen (3,8% - 25%) bei Zecken exponierten Risikogruppen für HGE. Zum Vorkommen der Humanen Babesiose (*B. microti*) gibt es Daten aus Deutschland und der Schweiz (1,5% - 10,8%). Als ursächlicher Erreger Humaner Babesiosen in Europa wurde bisher hauptsächlich *B. divergens* angesehen. *B. microti* scheint aber, wie auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, eine weit wichtigere Rolle zu spielen, als angenommen wurde.

In Deutschland konnte bis heute noch keine akute HGE-Erkrankung durch PCR diagnostiziert werden. Die Annahme, dass die Erkrankung auch in Deutschland vorkommt basiert momentan auf Seroprävalenzstudien und Zeckeninfektionsraten. Es gibt in Europa bisher keine standardisierte Methode zum Nachweis von PCR-amplifizierter HGE-DNA aus Patientenblut. Die erfolgreich angewandten Methoden unterscheiden sich stark hinsichtlich der Wahl des DNA-Isolierungsverfahrens und der

Wahl der Primer. Im Gegensatz zur einheitlich standardisierten Labordiagnostik bei Lyme-Borreliose und RMSF ist kein optimaler Algorithmus für die Laborbestätigung der Humanen Ehrlichiose und Babesiose etabliert. Es besteht somit weiterhin großer Forschungsbedarf auf dem Gebiet der durch Zecken übertragenen Erkrankungen in Deutschland und Europa.

7 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

1. Gordon et al. (1932): W. S. Gordon, A. Brownlee, D. R. Wilson, J. McLeod, Tick-Borne Fever (a Hitherto Undescribed Disease of Sheep). *Journal of Comparative Pathology* 42 (1932), 301-312
2. Misao et al. (1954): T. Misao, Y. Kobayashi, Studies on the Infectious Mononucleosis (Glandular Fever). I. Isolation of Etiologic Agent from Blood, Bone Marrow and Lymph Node of a Patient with Infectious Mononucleosis by Using Mice. *Tokyo Iji Shinshi* 71 (1954), 683-686
3. Anderson et al. (1991): B. E. Anderson, J. E. Dawson, D. C. Jones, K. H. Wilson, Ehrlichia Chaffeensis, a New Species Associated with Human Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (1991), 2828-2842
4. Maeda et al. (1987): K. Maeda, N. Markowitz, R. C. Hawley, M. Ristic, D. Cox, J. McDade, Human Infection with Ehrlichia Canis, a Leucocytic Rickettsia. *The New England Journal of Medicine* 316 (1987), 853-856
5. Chen et al. (1994): S. M. Chen, J. S. Dumler, J. S. Bakken, D. H. Walker, Identification of Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (1994), 589-595
6. Goodman et al. (1996): J. L. Goodman, C. Nelson, B. Vitale, J. E. Madigan, J. S. Dumler, T. J. Kurtti, U. G. Munderloh, Direct Cultivation of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine*. 334 (1996), 209-215
7. Smith et al. (1893): T. Smith, F. L. Kilbourne, Investigation into the Nature, Causation and Prevention of Texas or Southern Cattle Fever. Washington, DC: US Department of Agriculture (1893)
8. Gorenflot et al. (1998): A. Gorenflot, K. Moubri, E. Precigout, B. Carcy, T. P. Schettters, Human Babesiosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92 (1998), 489-501

9. Scholtens et al. (1968): R. G. Scholtens, E. H. Braff, G. A. Healey, N. Gleason, A Case of Babesiosis in the United States. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17 (1968), 810-813
10. Kjemtrup et al. (2000): A. M. Kjemtrup, A. Conrad, Human babesiosis: an emerging Tick-borne disease. *International Journal for Parasitology* 30 (2000), 1323-1337
11. Bakken et al. (2000): J. S. Bakken, J. S. Dumler, Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases* 31 (2000), 554-560
12. Dumler et al. (1995): J. S. Dumler, J. S. Bakken, Ehrlichial Diseases in Humans: emerging Tick-Borne Infections. *Clinical Infectious Diseases* 20 (1995), 1102-1110
13. Popov et al. (1998): V. L. Popov, V. C. Han, S. M. Chen, Ultrastructural differentiation of the Genogroups in the Genus Ehrlichia. *Journal of Medical Microbiology* 47 (1998), 235-251
14. Chaichanasiriwithaya et al. (1994): W. Chaichanasiriwithaya, Y. Rikihisa, S. Yamamoto et al. Antigenic, Morphologic and Molecular Characterization of New Ehrlichia Risticii Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (1994), 3026-3033
15. Buller et al. (1999): R. S. Buller, M. Arens, S. P. Hmiel, C. D. Paddock, J. W. Sumner, Y. Richisa, A. Unver, M. Gaudreault-Keener, F. A. Manian, A. M. Liddell, N. Schmulewitz, G. A. Storch. Ehrlichia ewingii, a New Recognized Agent of Human Ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* 341 (1999), 148-155
16. Wen et al. (1996): B. Wen, Y. Rikihisa, S. Yamamoto, N. Kawabata, A. Fuerst, Characterization of the SF Agent, an Ehrlichia sp. Isolated from the fluke *Stellantchasmus falcatus* by 16SrRNA Base Sequence, Serological and Morphological Analyses. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (1996), 149-154

17. Levine et al. (1980): N. D. Levine, J. O. Corliss, F. E. Cox, G. Deroux, J. Grain, B. M. Honigberg, G. F. Leedale, A. R. Loeblich, J. Lom, D. Lynn, E. G. Merinfeld, F. C. Page, G. Poljansky, V. Sprague, J. Vavra, F. G. Wallace, A Newly Revised Classification of the Protozoa. *The Journal of Protozoology* 27 (1980), 37-58
18. Persing et al. (1995): D. H. Persing, A. Conrad, Babesiosis: New Insights from phylogenetic Analysis. *Infectious Agents and Diseases* 4 (1995), 182-195
19. Homer et al. (2000): M. J. Homer., I. Aguilar-Delfin, S. R. Telford 3rd, J. Krause, D. H. Persing, Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13 (2000), 451-469
20. Rikihisa (1991): Y. Rikihisa, The Tribe Ehrlichia and Ehrlichial Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4 (1991), 589-595
21. Horowitz et al. (1996): H. W. Horowitz, S. J. Marks, M. Weintraub, J. S. Dumler, Brachial Plexopathy associated with Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Neurology* 46 (1996), 1026-1029
22. Shea et al. (1996): K. W. Shea, A. J. Calio, N. C. Klein, B. A. Cunha, Ehrlichia Equi Infection Associated with Rhabdomyolysis. *Clinical Infectious Diseases* 22 (1996), 605
23. Webster et al. (1998): P. Webster, J. W. Ijdo, L. M. Chicoine, E. Fikrig, The Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Resides in an Endosomal Compartment. *Journal of Clinical Investigation* 101 (1998), 1932-1941
24. Wells et al. (1988): M. Y. Wells, Y. Rikihisa, Lack of Lysosomal Fusion with Phagosomes Containing Ehrlichia Risticii in P388D1 Cells : Abrogation of Inhibition with Oxytetracycline. *Infection and Immunity* 56 (1988), 3209-3215
25. Kalantarpour et al. (2000): F. Kalantarpour, I. Chowdhury, G. P. Wormser, M. E. Agüero-Rosenfeld, Survival of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent under Refrigeration Conditions. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2000), 2398-2399

26. Goodman et al. (1999): J. L. Goodman, C. M. Nelson, M. B. Klein, S. F. Hayes, B. W. Weston, Leukocyte Infection by the Granulocytic Ehrlichiosis Agent Is Linked to Expression of a Selecting Ligand. *Journal of Clinical Investigation* 103 (1999), 407-412
27. Herron et al. (2000): M. J. Herron, C. M. Nelson, J. Larson, K. R. Snapp, G. S. Kansas, J. L. Goodman, Intracellular Parasitism by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Bacterium Through the P-Selectin Ligand, PSGL-1. *Science* 288 (2000), 1653-1656
28. Rosner et al. (1984): F. Rosner, M. H. Zarrabi, J. L. Benach, G. S. Habicht, Babesiosis in Splenectomized Adults: Review of 22 Reported Cases. *The American Journal of Medicine* 76 (1984), 696-701
29. Mehlhorn et al. (1984): H. Mehlhorn, E. Shein, The Piroplasms: Life Cycle and Sexual Stages. *Advances in Parasitology* 23 (1984), 37-103
30. Fingerle et al. (1999): V. Fingerle, U. G. Munderloh, G. Liegl, B. Wilske, Coexistence of Ehrlichia of the Phagocytophila Group with Borrelia burgdorferi in Ixodes Ricinus from Southern Germany. *Medical Microbiology and Immunology* 188 (1999), 145-149
31. Petrovec et al. (1999): M. Petrovec, J. W. Sumner, W. L. Nicholson et al. Identity of Ehrlichial DNA Sequences Derived from Ixodes Ricinus Ticks with those Obtained from Patients with Human Granulocytic Ehrlichiosis in Slovenia. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 209-210
32. Levin et al. (1999): M. L. Levin, F. des Vignes, D. Fish, Disparity in the Natural Cycles of Borrelia Burgdorferi and the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases* 995 (1999), 204-208
33. Stafford et al. (1999): K. C. Stafford, R. F. Massung, L. A. Magnarelli, J. W. Ijdo, J. F. Anderson, Infection with the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, Lyme Disease and Babesiosis in Wild White-Footed Mice in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 2887-2892

34. Walls et al. (1998): J. J. Walls, K. M. Asanovich, J. S. Bakken, J. S. Dumler, Serologic Evidence of a Natural Infection of White-Tailed Deer in Wisconsin and Maryland. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5 (1998), 762-765
35. Krauss et al. (1997): H. Krauss, A. Weber, B. Endres, H. G. Schiefer, W. Slenczka, H. Zahner, Zoonosen: Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. Deutscher Ärzteverlag Köln (1997), S. 30-32; 106-111; 343-346
36. Bakken et al. (1996): J. S. Bakken, J. Krueth, C. Wilson-Nordskog, R. L. Tilden, K. Asanovich, J. S. Dumler, Clinical and Laboratory Characteristics of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The Journal of the American Medical Association* 275 (1996), 199-205
37. Horowitz et al. (1998): H. W. Horowitz, E. K. Kilchewski, S. Haber, et al. Perinatal Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The New England Journal of Medicine* 339 (1998), 375-378
38. Katavolos et al. (1998): P. Katavolos, P. Armstrong, J. E. Dawson, S. R. Telford, Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. *Journal of Infectious Diseases* 177 (1998), 1422-1425
39. Bakken et al. (1996): J. S. Bakken, J. Krueth, T. Lund, D. Malkovitch, K. Asanovich, J. S. Dumler, Exposure to Deer Blood May Be a Cause of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases* 23 (1996), 198
40. Telford et al. (1998): S. R. Telford, A. Spielman, Babesiosis of humans (1998), 349-359. In: L. Collier, A. Balows, M. Sussman (ed.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, 9th ed, vol. 5. Arnold, London, England.
41. Randolph (1975): S. E. Randolph, Patterns of distribution of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula on its hosts. *Journal of Animal Ecology* 44 (1975), 425-449
42. Gunders (1977): A. E. Gunders, Piroplasmal Sporozoites in the Argasid *Ornithodoros erraticus* (Lucas). *Experientia* 33 (1977), 892-893

43. Piesman et al. (1987): J. Piesman, T. N. Mather, R. J. Sinsky, A. Spielman, Duration of Tick Attachment and *Borrelia burgdorferi* Transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 25 (1987), 557-558
44. Ribeiro (1987): J. M. Ribeiro, Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. *Annual Review of Entomology* 32 (1987), 463-478
45. McQuiston et al. (2000): J. McQuiston, J. E. Childs, M. E. Chamberland, E. Tabor, Transmission of Tick-Borne Agents of Disease by Blood Transfusion: A Review of Known and Potential Risks in the United States. *Transfusion* 40 (2000), 274-284
46. Smith et al. (1986): R. P. Smith, A. T. Evans, M. Popowsky, L. Mills, A. Spielman, Transfusion-Acquired Babesiosis and Failure of Antibiotic Treatment. *The Journal of the American Medical Association* 256 (1986), 2726-2727
47. Esernio-Jenssen et al. (1987): D. Esernio-Jenssen, P. G. Scimeca, J. L. Benach, M. J. Tenenbaum, Transplacental/Perinatal Babesiosis. *Journal of Pediatrics* 110 (1987), 570-572
48. New et al. (1997): D. L. New, J. b. Quinn, M. Z. Qureshi, S. J. Sigler, Vertically Transmitted Babesiosis. *Journal of Pediatrics* 131 (1997), 163-164
49. Hofmeister et al. (1998): E. K. Hofmeister, C. P. Kolbert, A. S. Abdulkarim, J. M. Magera, M. K. Hopkins, J. R. Uhl, A. Ambyaye, S. R. Telford 3rd, F. R. Cockerill 3rd, D. H. Persing. Cosegregation of a Novel *Bartonella* Species with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in *Peromyscus leucopus*. *Journal of Infectious Diseases* 177 (1998), 409-416
50. Baumgarten et al. (1999): B. U. Baumgarten, M. Röllingshoff, C. Bogdan, Prevalence of *Borrelia Burgdorferi* and Granulocytic and Monocytic Ehrlichiae in *Ixodes Ricinus* Ticks in Southern Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 3448-3451
51. Fingerle et al. (1997): V. Fingerle, J. L. Goodman, R. C. Johnson, T. J. Kurtti,

- U. G. Munderloh, B. Wilske. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Southern Germany: Increased Seroprevalence in High-Risk Groups. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), 3244-3247
52. Parola et al. (1998): P. Parola, B. Lorenza, M. Camion, P. Brouqui, D. Raoult, Ehrlichial DNA Amplified from *Ixodes Ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *Journal of Medical Entomology* 34 (1998), 180-183
53. Alberdi et al. (1998): M. P. Alberdi, A. R. Walzer, E. A. Praxton, K. J. Sumption, Natural Prevalence of Infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes Ricinus* Ticks in Scotland. *Veterinary Parasitology* 78 (1998), 203-213
54. Cinco et al.(1997): M. Cinco, D. Padovan, R. Murgia et al. Coexistence of *Ehrlichia Phagocytophila* and *Borrelia Burgdorferi* in *Ixodes Ricinus* Ticks from Italy as Determined by 16SrRNA Gene Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), 3365-3366
55. von Stedingk et al. (1997): L. V. von Stedingk, M. Gürtelschmid, H. S. Hanson, R. Gustafson, L. Dotevall, E. Olsson Engvall, M. Granström, The Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE) Agent in Swedish Ticks. *Clinical Microbiology and Infection* 3 (1997), 573-574
56. Schouls et al. (1999): L. M. Schouls, I. Van de Pol, S. G. T. Rijpkema, C. S. Schot, Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia Burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes Ricinus* Ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 2215-2222
57. Pusterla et al. (1998): N. Pusterla, J. B. Huder, H. Lutz, U. Braun, Detection of *Ehrlichia Phagocytophila* DNA in *Ixodes Ricinus* Ticks from Areas in Switzerland where Tick-Borne Fever is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (1998), 2735-2736
58. Pusterla et al. (1999): N. Pusterla, C. M. Leutenegger, J. B. Huder, R. Weber, U. Braun, H. Lutz, Evidence of the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in

- Ixodes Ricinus Ticks in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 13332-1334
59. Baumgarten et al. (2000): B. U. Baumgarten, M. Röllingshoff, C. Bogdan, Ehrlichien. Durch Zecken Übertragbare Erreger. *Deutsches Ärzteblatt* 38 (2000), S. 1857-1863
60. Bakken et al. (1996): J. S. Bakken, J. Krueth, R. L. Tilden, B. E. Kristiansen, J. S. Dumler, Serological Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Norway. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 15 (1996), 829-832
61. Brouqui et al. (1995): P. Brouqui, J. S. Dumler, R. Leinhard, M. Brossard, D. Raoult, Human Granulozytic Ehrlichiosis in Europe. *The Lancet* 346 (1995), 782-783
62. Dumler et al. (1997): J. S. Dumler, L. Dotevall, R. Gustafson, M. Granström, A Population-Based Seroepidemiologic Study of Human Granulocytic Ehrlichiosis on the West Coast of Sweden. *The Journal of Infectious Diseases* 175 (1997), 720-722
63. Lebech et al. (1998): A. M. Lebech, K. Hansen, P. Pancholi, L. M. Sloan, J. M. Magera, D. H. Persing, Immunological Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Danish Patients with Lyme Neuroborreliosis. *The Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 30 (1998), 173-176
64. Sumption et al. (1995): K. J. Sumption, D. J. M. Wright, S. J. Cutler, B. A. S. Dale, Human Ehrlichiosis in the UK. *Lancet* 346 (1995), 1487-1488
65. Hunfeld et al. (1999): K. P. Hunfeld, V. Brade, Prevalence of Antibodies against the Human Granulozytic Ehrlichiosis Agent on Lyme Borreliosis Patients from Germany. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (1999), 221-224
66. Bakken et al. (1998): J. S. Bakken, P. Goellner, M. V. Etten, D. Z. Boyle, O. L. Swonger, S. Mattson, J. Krueth, R. L. Tilden, K. Asanovich, J. Walls, J. S.

- Dumler, Seroprevalence of Human Granulocytic Ehrlichiosis among Permanent Residents of Northwestern Wisconsin. *Clinical Infectious Disease* 27 (1998), 1491-1496
67. Wong et al. (1997): S. L. Wong, G. S. Brady, J. S. Dumler, Serologic Responses to *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Borrelia burgdorferi* in Patients from New York State. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), 2198-2205
68. Thompson et al. (2001): C. Thompson, A. Spielman, P. Krause, Coinfecting Deer-Associated Zoonoses: Lyme Disease, Babesiosis, and Ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases* 33 (2001), 676-685
69. Perez et al. (1996): Perez, Y. Rikihisa, B. Wen, *Ehrlichia canis*-like Agent Isolated from a Man in Venezuela: Antigenic and Genetic Characterization. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (1996), 562-568
70. Hunfeld et al. (1998): K. P. Hunfeld, R. Allwinn, S. Peters, P. Kraiczy, V. Brade, Serologic Evidence for Tick-Borne Pathogens Other than *Borrelia burgdorferi* (TOBB) in Lyme Borreliosis Patients from Midwest Germany. *Wiener Klinische Wochenschrift* 110 (1998), 901-908
71. Denes et al. (1999): E. Denes, J. P. Rogez, M. L. Dardé, P. Weinbreck, Management of *Babesia divergens* without a complete course of quinine treatment. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (1999), 672-673
72. Persing et al. (1995): D. H. Persing, B. L. Herwaldt, C. Glaser, R. S. Lane, J. W. Thomford, D. Mathiesen, P. J. Krause, D. F. Phillip, P. A. Conrad, Infection with a *Babesia*-like Organism in Northern California, *The New England Journal of Medicine* 332 (1995), 298-303
73. Herwaldt et al. (1997): B. L. Herwaldt, A. M. Kjemtrup, P. A. Konrad, R. C. Barnes, M. Wilson, M. G. McCarthy, M. H. Sayers, M. L. Eberhard, Transfusion-Transmitted Babesiosis in Washington State: First Reported Case Caused by a WA1-Type Parasite. *Journal of Infectious Diseases* 175 (1997),

1259-1262

74. Shih et al. (1997): C. M. Shih, L. P. Liu, W. C. Chung, S. J. Ong, C. C. Wang, Human Babesiosis in Taiwan: Asymptomatic Infection with a Babesia Microti-Like Organism in a Taiwanese Woman. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), 450-454
75. Bush et al. (1990): J. B. Bush, M. Isaacson, A. S. Mohamed, F. T. Potgieter, D. T. de Waal, Human Babesiosis: a Preliminary Report of 2 Suspected Cases in South Africa. *South African Medical Journal* 78 (1990), 699
76. Yoshiie et al. (2000): K. Yoshiie, H. Y. Kim, J. Mott, Y. Rikihisa, Intracellular Infection by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent Inhibits Human Neutrophil Apoptosis. *Infection and Immunity* 68 (2000), 1125-1130
77. Klein et al. (2000): M. B. Klein, S. Hu, C. C. Chao, J. L. Goodman, The Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Induces the Production of Proinflammatory Myelosuppressing Chemokines without Induction of Proinflammatory Cytokines. *Journal of Infectious Diseases* 182 (2000), 200-205
78. Dumler et al. (2000): J. S. Dumler, E. R. Trigiani, J. S. Bakken, M. E. Agüero-Rosenfeld, G. P. Wormser, Serum Cytokine Responses During Acute Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7 (2000), 6-8
79. Paddock et al. (1993): C. Paddock, d. P: Suchard, K. L. Grumbach, et al. Brief Report: Fatal Seronegative Ehrlichiosis in a Patient with HIV-Infection. *The New England Journal of Medicine* 329 (1993), 1164-1167
80. Bunnell et al. (1999): J. E. Bunnell, E. R. Trigiani, S. R. Srinivas, J. S. Dumler, Development and Distribution of Pathologic Lesions are Related to Immune Status and Tissue Deposition of Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent-Infected Cells in a Murine Model System. *The Journal of Infectious Diseases* 180 (1999), 546-550

81. Krause et al. (1998): P. J. Krause, A. Spielman, S. R. Telford, V. K. Sikand, K. McKay, D. Christianson, R. J. Pollack, P. Brassard, J. Magera, R. Ryan, D. H. Persing, Persistent Parasitemia after Acute Babesiosis. *The New England Journal of Medicine* 339 (1998), 160-165
82. Winger et al. (1989): C. M. Winger, E. U. Canning, J. D. Culverhouse, A Monoclonal Antibody-Derived Antigen of *Babesia divergens*: Characterization and Investigation of its Ability to Protect Gerbils Against Virulent Homologous Challenge. *Parasitology* 3 (1989), 341-348
83. Benach et al. (1982): J. L. Benach., G. S. Habicht, M. I. Hamburger, Immunoresponsiveness in Acute Babesiosis in Humans. *Journal of Infectious Diseases* 146 (1982), 369-380
84. Ruebush et al. (1980): M. J. Ruebush, W. L. Hanson Transfer of Immunity to *Babesia microti* of Human Origin Using T-Lymphocytes in Mice. *Cellular Immunology* 52 (1980), 255-265
85. Horowitz et al. (1998): H. W. Horowitz, M. E. Agüero-Rosenfeld, D. F. McKenna, D. Holmgreen, T.-C. Hsieh, S. A. Varde, J. S. Dumler, J. M. Wu, I. Schwarz, Y. Rikihisa, G. P. Wormser, Clinical and Laboratory Spectrum of Culture-proven Human Granulocytic Ehrlichiosis : Comparison with Culture-negative Cases. *Clinical Infectious Diseases* 27 (1998), 1314-1317
86. Persing et al. (1992): D. H. Persing, D. Mathiesen, W. F. Marshall, S. R. Telford, A. Spielman, J. W. Thomford, P. A. Conrad, Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (1992), 2097-2103.
87. Krause et al. (1996): P. J. Krause, S. R. Telford 3rd, A. Spielberg, R. Ryan, J. Magera, T. V. Rajan, D. Christianson, T. V. Alberghini, L. Bow, D. Persing, Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for the Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (1996), 2791-2794

88. McQuiston et al. (1999): J. McQuiston, C. D. Paddock, R. C. Holman, J. E. Childs, The human ehrlichiosis in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5 (1999), 635-642
89. Modi et al. (1999): K. S. Modi, D. C. Dahl, R. O. Berkseth, R. Schut, E. Greeno, Human Granulocytic Ehrlichiosis Presenting with Acute Renal Failure and Mimicking Thrombocytic Thrombocytopenic Purpura. A Case Report and Review. *American Journal of Nephrology* 19 (1999), 677-681
90. Jahangir et al. (1998): A. Jahangir, C. Kolbert, W. Edwards, P. Mitchell, J. S. Dumler, D. H. Persing, Fatal Pericarditis associated with Human Granulocytic Ehrlichiosis in a 44-Year-Old Man. *Clinical Infectious Diseases* 27(1998), 609-614
91. Gershel (2000): J. C. Gershel, Human Granulocytic Ehrlichiosis Presenting as Abdominal Pain. *Pediatrics* 106 (2000), 602-604
92. Hatcher et al. (2001): J. C. Hatcher, P. D. Greenberg, J. Antique, V. E. Jimenez-Lucho, Severe Babesiosis in Long Island: Review of 34 Cases and Their Complications. *Clinical Infectious Diseases* 32 (2001), 1117-1125
93. Lotriè-Furlan et al. (2000): S. Lotriè-Furlan, M. Petrovec, T. Avsic-Zupanc, F. Strle, Clinical Distinction between Human Granulocytic Ehrlichiosis and the Initial Phase of Tick-Borne Encephalitis. *Journal of Infection* 40 (2000), 55-58
94. Clark et al. (1998): I. A. Clark, L. S. Jacobson, Do Babesiosis and Malaria Share a Common Disease Process? *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92 (1998), 483-488
95. Ruebush et al. (1977): T. K. Ruebush, D. D. Juranek, E. S. Chisholm, P. Snow, G. Healy, A. Sulzer, Human Babesiosis on Nantucket Island. Evidence for Self-Limited and Subclinical Infections. *The New England Journal of Medicine* 297 (1977), 825-827

96. Dacey et al. (2001): M. Dacey, H. Martinez, T. Raimondo, C. Brown, J. Brady, Septic Shock Due to Babesiosis. *Clinical Infectious Diseases* 33 (2001), e37-e38
97. Falagas et al. (1996): M. E. Falagas, M. S. Klemperer, Babesiosis in a Patient with AIDS: a Chronic Infection Presenting as Fever of Unknown Origin. *Clinical Infectious Diseases* 22 (1996), 809-812
98. Slovut et al. (1996): D. P. Slovut, E. Benedetti, a. J. Matas, Babesiosis and Hemophagocytic Syndrome in a Asplenic Renal Transplant Recipient. *Transplantation* 62 (1996), 537-539
99. Krause et al. (2000): P. J. Krause, T. Lepore, V. K. Sikand, J. Gadbow, Jr, G. Burke, S. R. Telford, P. Brassard, D. Pearl, J. Azlanzadeh, D. Christianson, D. McGrath, A. Spielman, Atovaquone and Azitromycin for the Treatment of Babesiosis. *The New England Journal of Medicine* 343 (2000), 1454-1458
100. Pancholi et al (1995): P. Pancholi, C. P. Kolbert, P. D. Mitchell, K. D. Reed, J. S. Dumler, J. S. Bakken, S. R. Telford, D. H. Persing, *Ixodes dammini* as a Potential Vector of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases* 172 (1995), 1007-1012
101. Dumler et al. (1995): J. S. Dumler, K. M. Asanovich, J. S. Bakken, P. Richter, R. Kimsey, J. E. Madigan, Serologic Cross-Reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and Human Granulocytic Ehrlichia. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1995), 1098-1110
102. Walls et al. (1999): J. J. Walls, M. Agüero-Rosenfeld, J. S. Bakken, J. L. Goodman, D. Hossain, R. C. Johnson, J. S. Dumler, Inter- and Intralaboratory Comparison of *Ehrlichia equi* and Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE) Agent Strains for Serodiagnosis of HGE by the Immunofluorescent-Antibody Test. *The Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 2968-2973
103. Pusterla et al. (1998): N. Pusterla, R. Weber, C. Wolfensberger et al. Serological Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17 (1998), 207-209

104. Skarphedinsson et al. (2001): S. Skarphedinsson, P. Sogaard, C. Pederson, Seroprevalence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in High-risk Groups in Denmark. *The Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 33 (2001), 206-210
105. Thomas et al. (1998): D. R. Thomas, M. Sillis, T. J. Coleman, S. M. Kench, N. H. Ogden, R. L. Salmon, P. Morgan-Capner, P. Softley, D. Meadows, Low Rates of Ehrlichiosis and Lyme Borreliosis in English Farmworkers. *Epidemiology and Infection* 121 (1998), 609-614
106. Nuti et al. (1998): M. Nuti, D. A. Serafini, D. Bassetti, A. Ghionni, F. Russino, P. Rombola, G. Macri, E. Lillini, Ehrlichia Infection in Italy. *Emerging Infectious Diseases* 4 (1998), 663-665
107. Christova et al. (1999): I. S. Christova, J. S. Dumler, Human Granulocytic Ehrlichiosis in Bulgaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 60 (1999), 58-61
108. Cizman et al. (2000): M. Cizman, T. Avisic-Zupanc, M. Petrovec, E. Ruzic-Sabljic, M. Pokorn, Seroprevalence of Ehrlichiosis, Lyme Borreliosis and Tick-borne Encephalitis in Children and Young Adults in Slovenia. *Wiener Klinische Wochenschrift* 13 (2000), 842-845
109. Wittesjo et al. (2001): B. Wittesjo, A. Bjoersdorff, I. Eliasson, J. Berglund, First Long-term Study of Seroreponse to the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Among Residents of a Tick-endemic Area of Schweden. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 (2001), 173-178
110. Oteo et al. (2001): J. A. Oteo, H. Gil, M. Barral, A. Perez, S. Jimenez, J. R. Blanco, V. Martinez de Artola, A. Garcia-Perez, R. A. Juste, Presence of Granulocytic Ehrlichia in Ticks and Serological Evidence of Human Infection in La Rioja, Spain. *Epidemiology and Infection* 127 (2001), 353-358.
111. Woessner et al. (2001): R. Woessner, B. C. Gaertner, M. T. Grauer, K. Weber, N. Mueller-Lantzsch, K. P. Hunfeld, J. Treib, Incidence and Prevalence of Infection with Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent in Germany. A

Prospective Study in Young Healthy Subjects. *Infection* 29 (2001), 271-273

112. Magnarelli et al. (1995): L. A. Magnarelli, J. S. Dumler, J. F. Anderson, R. C. Johnson, E. Fikrig, Coexistence of Antibodies to Tick-Borne Pathogens of Babesiosis, Ehrlichiosis, and Lyme Borreliosis in Human Sera. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1995), 3054-3057
113. Mitchell et al. (1996): P. D. Mitchell, J. M. Reed, J. M. Hofkes, Immunserologic Evidence of Coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and Human Granulocytic Ehrlichia in Residents of Wisconsin and Minnesota. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (1996), 724-727
114. Fritz et al. (1997): C. L. Fritz, A. M. Kjemtrup, P. A. Konrad, G. P. Flores, G. L. Campbell, M. E. Schriefer, D. Gallo, D. J. Vugia, Seroepidemiology of Emerging Tick-Borne Infectious Diseases in a Northern California Community. *Journal of Infectious Diseases* 175 (1997), 1432-1439
115. Petrovec et al. (1997): M. Petrovec, S. L. Furlan, T. A. Zupanc, F. Stryle, P. Brouqui, V. Roux, J. S. Dumler, Human Disease in Europe Caused by a Granulocytic Ehrlichia Species. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (1997), 1556-1559
116. Comer et al. (1999): J. A. Comer, W. L. Nickolson, J. W. Sumner, J. G. Olson, J. E. Childs, Diagnosis of Human Ehrlichiosis by PCR assay of Acute-Phase Serum. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 31-34
117. Lotriè-Furlan et al. (1998): S. Lotriè-Furlan, M. Petrovec, T. Y. Zupanc et al. Human Granulocytic Ehrlichiosis in Europe : Clinical and Laboratory Findings for Four Patients from Slovenia. *Clinical Infectious Diseases* 27 (1998), 424-428
118. Van Dobbenburgh et al. (1999): A. Van Dobbenburgh, A. P. van Dam, E. Fikrig, Human Granulocytic Ehrlichiosis in Western Europe. *The New England Journal of Medicine* 340 (1999), 1214-1216

119. Tylewaka-Wierzbanowska et al. (2001): S. Tylewaka-Wierzbanowska, T. Chmielewski, M. Kondrusik, T. Hermanowska-Szpakowicz, W. Sawicki, K. Sulek, First Cases of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Poland. *European Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 20 (2001), 196-198
120. Wormser et al. (1996): G. P. Wormser, H. W. Horowitz, J. S. Dumler, I. Schwartz, M. Aguero-Rosenfeld, False-positive Lyme Disease Serology in Human Granulocytic Ehrlichiosis. *The Lancet* 347 (1996), 981-982
121. Krause et al. (1996): P. J. Krause, R. Ryan, S. R. Telford, D. Persing, A. Spielman, Efficacy of Immunoglobulin M Serodiagnostic Test for Rapid Diagnosis of Acute Babesiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (1996), 2014-2016
122. Walls et al. (2000): J. J. Walls, P. Caturegli, J. S. Bakken, K. M. Asanovich, J. S. Dumler, Improved Sensitivity of PCR for Diagnosis of Human Granulocytic Ehrlichiosis Using *epank1* Genes of Ehrlichia phagocytophila-Group Ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (2000), 354-356
123. Pusterla et al. (1999): N. Pusterla, J. B. Huder, C. M. Leutenegger, U. Braun, J. E. Madigan, H. Lutz, Quantitative Real-time PCR for Detection of Members of the Ehrlichia phagocytophila Genogroup in Host Animals and Ixodes ricinus Ticks. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (1999), 1329-1331
124. Bakken et al. (1994): J. S. Bakken, J. S. Dumler, S. M. Chen, L. L. van Etta, M. R. Eckman, D. H. Walker, Human Granulocytic Ehrlichiosis in the United States: A New Species Emerging? *The Journal of the American Medical Association* 272 (1994), 212-218
125. Björnsdorff et al. (1999): A. Björnsdorff, J. Berglund, B. E. Kristiansen, C. Soderstrom, I. Eliasson, Variable Presentation and Course in Human Granulocytic Ehrlichiosis: Twelve Case Reports of the New Tick-Borne Zoonosis. *Lakartidningen* 96 (1999), 4200-4204
126. Arnez et al. (2001): M. Arnez, M. Petrovec, S. Lotriè-Furlan, T. A. Zupanc, F.

- Strle, First European Pediatric Case of Human granulocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 39 (2001), 4591-4592
127. Dumler et al. (2001): J. S. Dumler, A. F. Barbet, C. P. J. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, F. R. Rurangirwa, 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, description 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 (2001), 2145-2165
128. Lederberg et al. (1992): Institute of Medicine (US), Committee on Emerging Microbial Threats to Health, J. Lederberg, R. E. Shope, S. C. Oaks, *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. Washington: National Academy Press (1992)
129. Von Loewenich et al. (2003): F. D. von Loewenich, G. Stumpf, B. U. Baumgarten, M. Rollinghoff, J. S. Dumler, C. Bogdan: A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic Anaplasma phagocytophilum (HGE agent) in Germany. *European Journal of Microbiology and Infectious diseases* 22 (2003), 303-305
130. Aguero-Rosenfeld (2003): M. Aguero-Rosenfeld, *Laboratory Aspects of Tick-Borne Diseases: Lyme, Human Granulocytic Ehrlichiosis and Babesiosis*. The Mount Sinai Journal of Medicine 70 (2003), 197-206
131. Moss et al. (2003): W. J. Moss, J. S. Dumler, Simultaneous infection with Borrelia burgdorferi and human granulocytic ehrlichiosis. *Journal of Pediatric Infectious diseases* 22 (2003), 91-92
132. Guillaume et al. (2002): B. Guillaume, P. Heyman, S. Lafontaine, C. Vandenvelde, M. Delmee, G. Bigaignon, Seroprevalence of human granulocytic ehrlichiosis infection in Belgium. *European Journal of Microbiology and Infectious diseases* 21 (2002), 397-400

133. Foppa et al. (2002): I. M. Foppa, P. J. Krause, A. Spielman, H. Goethert, L. Gern, B. Brand, S. R. Telford, Entomologic and Serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, Eastern Switzerland. *Emerging Infectious diseases* 8 (2002), 722-726

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	acquired immune deficiency syndrome; erworbenes Immundefektsyndrom.
ARDS	adult respiratory distress syndrome; akute respiratorische Insuffizienz.
B.	Babesia.
DNA	deoxiribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure.
E.	Ehrlichia.
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay; heterogener Enzym-Immunoassay.
FCS	Fetales Kälber Serum.
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer.
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; neue Bezeichnung: Aspartataminotransferase.
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase; neue Bezeichnung: Alaninaminotransferase.
HGE	Humane Granulozytäre Ehrlichiose.
HL60	Humane Leukämiezelllinie 60.
HME	Humane Monozytäre Ehrlichiose.
IFN	Interferon.
IFT	Immunfluoreszenztest.
Ig	Immunglobuline.
IgG	Immunglobuline der Klasse G.

IgM	Immunglobuline der Klasse M.
LB	Lyme-Borreliose.
LDH	Laktatdehydrogenase.
NK-Zelle	natürliche Killerzelle.
NO	nitric oxide; Stickoxid.
nss-rDNA	nuclear small subunit-ribosomal DNA.
PBS	phosphate buffer saline.
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion.
RMSF	rocky mountain spotted fever.
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure (RNS).
rRNA	ribosomale RNA.
ROS	reactive oxygen species.
rpm	rounds per minute.
spp	Spezies.
TNF	Tumor Nekrose Faktor.
TOBB	tick-borne disease other than Borrelia burgdorferi.
TSS	Toxic Schock Syndrom.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum anhand von Homologien der 16SrRNA-Sequenzen. Humanpathogene Erreger sind mit einem * markiert 5

Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Piroplasmen anhand 18S ss rRNA Gensequenzanalysen. Humanpathogene Spezies sind mit einem * gekennzeichnet. 7

Abbildung 3: Entwicklungszyklus der Ehrlichien..... 9

Abbildung 4: Lebenszyklus der Ixodes Zecken, am Beispiel von Ixodes scapularis. 12

Abbildung 5: Lebenszyklus der Babesien. 14

Abbildung 6: Komponenten der Immunantwort auf eine Babesieninfektion 20

Abbildung 7: Schematische Darstellung des Light-Cyclers der Firma Roche. 33

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)..... 35

Abbildung 9: HGE-IFT unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung..... 37

Abbildung 10: Babesien-IFT unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. 38

10 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über Erscheinungsform, Erreger, Wirt, Vektor und Vorkommen der Ehrlichiosen	16
Tabelle 2: Verteilung der Antikörpertiter gegen <i>B. burgdorferi</i> im Kollektiv der Waldarbeiter	29
Tabelle 3: Verteilung der Antikörpertiter gegen HGE im Kollektiv der gesunden Blutspender	29
Tabelle 4: Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse. Verteilung der Antikörpertiter für HGE und <i>B. microti</i> in verschiedenen Risikokategorien für Zeckenexposition	44
Tabelle 5: Kreuztabelle für den Vergleich der Waldarbeiterseren mit den Seren gesunder Blutspender	45
Tabelle 6: Kreuztabelle für den Vergleich Borreliose positiver mit Borreliose negativen Waldarbeiterseren in Bezug auf das Auftreten von Antikörpern gegen den Erreger der HGE.....	45
Tabelle 7: Kreuztabelle für den Vergleich Borreliose positiver mit Borreliose negativen Waldarbeiterseren in Bezug auf das Auftreten von Antikörpern gegen <i>B. microti</i>	46
Tabelle 8: Vergleich der europäischen Publikationen zur Antikörpertiterverteilung bei unterschiedlichen Risikogruppen in Bezug auf deren Zeckenexposition	51
Tabelle 9: Vergleich europäischer und außereuropäischer Studien zur Antikörpertiterverteilung bei unterschiedlichen Risikogruppen in Bezug auf deren Zeckenexposition	55

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich beim Verfassen dieser Arbeit über die Jahre unterstützten, insbesondere Herrn Dr. med. Johannes Mayer, der mich während dieser Zeit hervorragend fachlich begleitete und das Entstehen der Arbeit erst ermöglichte.

In erster Linie gilt mein besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. Eva- B. Bröcker für die fachliche Betreuung und Begutachtung der Arbeit.

Mein besonderer Dank sei außerdem an Herrn Prof. Dr. med. Hans W. Kreth der Kinderklinik für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit gerichtet.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen im Routinelabor der Dermatologie für das Einführen in die Labormethoden, die Nutzung der Labormöglichkeiten und die freundliche Zusammenarbeit; ganz besonders bei Sibylle Schmidt für die Unterstützung bei der Granulozytenseparation, die wissenschaftlichen Tipps und das Interesse an der Versuchsplanung und –durchführung.

Besonders hervorheben möchte ich auch die Geduld meiner Mutter, die durch wiederholtes sorgfältiges Korrekturlesen manchen unerkannt gebliebenen Fehler doch noch entdeckte.

Meinem Freund Rainer danke ich von ganzem Herzen für seine unendliche Geduld und die liebevolle Unterstützung während des Entstehens dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marcia Scheller
Geburtsdatum: 18. Dezember 1976
Geburtsort: Würzburg
Konfession: röm.kath.
Familienstand: ledig

Schulausbildung:

07/1982 – 06/1986 Grundschole in Dettelbach
07/1986 – 06/1994 Armin-Knab-Gymnasium in Kitzingen
07/1994 – 06/1996 Egbert-Gymnasium Münsterschwarzach
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

seit 05/1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
03/1999 Ärztliche Vorprüfung(Physikum)
03/2000 1. Staatsexamen
08/2002 2. Staatsexamen
10/2002 – 08/2003 Praktisches Jahr im Tropenkrankenhaus in Manaus/Brasilien,
in der chirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Salvador da
Bahia/Brasilien,
in der Abteilung für Innere Medizin des Lehrkrankenhauses der
Universität Cardiff in Bangor, Großbritannien und
An der Universitätskinderklinik in Würzburg
11/2003 3. Staatsexamen
10/2001 – 07/2003 Studium der Portugiesischen Sprache an der Universität Würzburg,
Abschluss: Lusitanicum

Berufliche Tätigkeit

seit 02/2004 PRHO(AiP) Innere Medizin im Lehrkrankenhaus der Universität
Cardiff in Bangor, Großbritannien

Würzburg, den 04. Oktober 2004