

Aus der Klinik und Poliklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten  
der Universität Würzburg

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

Seroprävalenz der Humanen Granulozytären Ehrlichiose in verschiedenen  
Risikogruppen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Christian Stolz  
aus Würzburg

Würzburg, Februar 2003

Referentin: Prof. Dr. med. E.-B. Bröcker

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Böck

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2003

Der Promovend ist Arzt

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Humane Granulozytäre Ehrlichiose (HGE)	1
1.2. Borreliose - ein Überblick	7
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>10</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>11</b>
3.1. Material	11
3.1.1. Patientenseren	11
3.1.2. Seren der Blutspender	12
3.1.3. Inhaltsstoffe des IgG-Immunfluoreszenztests	12
3.1.4. Inhaltsstoffe des IgM-Immunfluoreszenztests	13
3.1.5. Reagenzien	13
3.1.5.1. DNA-Extraktion	13
3.1.5.2. Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
3.1.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	14
3.1.6. Geräte und Zubehör	14
3.1.7. Verbrauchsmaterial	15
3.2. Methode	15
3.2.1. Testprinzip	15
3.2.1.1. IgG-Immunfluoreszenztest	16
3.2.1.2. IgM-Immunfluoreszenztest	17
3.2.2. Auswertung des Testes	18
3.2.3. Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als molekulares Nachweisverfahren der HGE	19
3.2.3.1. Beschreibung der PCR	19
3.2.3.2. Vorsichtsmaßnahmen	20
3.2.3.3. Isolierung von HGE-DNA	20

3.2.3.4.	Vorbereitung der Proben	21
3.2.3.5.	Protokoll der PCR mit den Primern GER 3/4	22
3.2.3.6.	Protokoll der PCR mit den Primern Ehr 521/747	22
3.2.3.7.	Nested PCR	23
3.2.3.8.	Agarose-Gelelektrophorese	24
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
4.1.	Ergebnis der Seroprävalenzstudie	25
4.2.	Ergebnisse der PCR und Nested PCR	26
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>27</b>
5.1.	Vergleich publizierter Daten mit eigenen Ergebnissen	27
5.2.	Wertigkeit der Methoden	38
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung und Beurteilung der eigenen Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>41</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>48</b>
8.1.	Abbildungen von intraleukozytären HGE-Aggregaten (Morulae)	48
8.2.	Fotografien von positiven und negativen Immunfluoreszenztests	49
8.3.	Abbildung der Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter DNA-Fragmente von Humanen Granulozytären Ehrlichien	52

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Die Humane Granulozytäre Ehrlichiose (HGE)

Der erste Erreger der späteren Gattung *Ehrlichia*, *Anaplasma marginale*, wurde 1910 im Tierreich entdeckt. Man identifizierte ihn als Auslöser einer weltweit auftretenden Veterinärerkrankung. Es folgte die Beschreibung weiterer tierpathogener Arten, die später in die Gattung *Ehrlichia* eingeordnet werden konnten (1925 *Cowdria ruminantium*, 1935 *E. canis*, 1940 *E. phagocytophila*). Diese Gattung wurde 1945 etabliert und zu Ehren Paul Ehrlichs mit seinem Namen bedacht (s.a. Tabelle 1).

Nach und nach wurden weitere Arten der genannten Gattung beschrieben. Das Interesse nahm zu, nachdem im Zeitraum von 1968 bis 1970 mehr als 200 Militärhunde an der Kaninchenehrlichiose in Vietnam starben [5, 47].

Die erste menschliche Infektion mit Ehrlichien war das Sennetsu-Fieber, das 1954 (*E. sennetsu*) in Japan auftrat. Dabei handelt es sich um ein selbstlimitierendes Krankheitsbild das nur in Japan und Südostasien vorkommt. Es ist gekennzeichnet durch akutes Fieber, Schüttelfrost, Kopfschmerzen, generalisierte Lymphadenopathie und eventuell Spleno- und Hepatomegalie [29]. 1987 wurde die erste menschliche Infektion mit *E. chaffensis*, die Humane Monozytäre Ehrlichiose (HME), in den USA beschrieben. 1994 schließlich wurde ein granulozytotropher Erreger identifiziert, der nah verwandt war mit *E. phagocytophila* und *E. chaffensis*, der Erreger der Humanen Granulozytären Ehrlichiose. Obwohl die Auslöser der HME und der HGE verschiedene sind, werden bei diesen Erkrankungen die gleichen klinischen und laborchemischen Symptome und Veränderungen (s.u.) nachgewiesen. Deshalb wird eine ähnliche Pathogenese vermutet.

Ehrlichien sind kleine, obligat intrazelluläre Bakterien mit einer durchschnittlichen Länge von 0,5 – 1,5 µm. Ihre ultrastrukturelle Morphologie ist sehr variabel und bewegt sich zwischen kokkoid und unregelmäßigen Formen. Sie besitzen eine gramnegative Zellwand, obwohl keine Lipopolysaccharide und Lipo-Oligosaccharide darin gefunden werden konnten. Sie vermehren sich in membranumhüllten Vakuolen, die im Giemsa-gefärbten Blutaussstrich als sogenannte Morulae in Granulozyten manchmal zu erkennen sind.

Die taxonomische und phylogenetische Einteilung von Mitgliedern der Gattung Ehrlichia beruht vor allem auf der Morphologie, dem Wirtszelltropismus und der Serologie.

Es existieren zur Zeit drei Genogruppen. In jeder gibt es einen humanpathogenen Erreger (in der Tabelle kursiv gedruckt).

<b>SPECIES EHRLICHIA</b>		
<b>E. canis – Genogruppe</b>	<b>E. phagocytophila – Genogruppe</b>	<b>E. sennetsu – Genogruppe</b>
E. canis	E. phagocytophila	<i>E. sennetsu</i>
<i>E. chaffensis</i>	E. equi	E. risticii
E. ewingii	<i>Humane granulozytäre Ehrlichien</i>	Neorickettsia helminthoeca
E. muris	E. platys	N. elocominica
Cowdria ruminantium	Anaplasma marginale	Stellantchasmus falcatus

Tabelle 1

[1, 5]

Nach derzeitigem Erkenntnisstand wird die Humane Granulozytäre Ehrlichiose vor allem durch die Schildzecke *Ixodes ricinus* und die Hundezecke *Dermacentor variabilis* übertragen. In einer Studie betrug der Durchseuchungsgrad von 510 in Süddeutschland gesammelten Schildzecken 1,6 % für granulozytäre Ehrlichien und 36,2 % für *Borrelia burgdorferi* sensu lato [52]. Das natürliche Reservoir des Erregers ist unklar, Vermutungen deuten auf Hirsche hin. Bei Tieren verursachen Ehrlichien oft persistierende Infektionen, begleitet von einer Ehrlichämie [40, 44]. Deshalb kann ein einmal infizierter Wirt seine Erreger auf viele noch nicht infizierte Zecken über einen langen Zeitraum hinweg übertragen. Dieser Mechanismus ist für die Ehrlichien eine wichtige evolutionäre Adaption, da bei einem schnellen Tod des infizierten Tieres die Möglichkeit des Erregers sich zu verbreiten sehr viel geringer wäre [10]. Für die Schildzecke existiert eine Studie, laut der diese mindestens 24 h an ihrem Wirt (im Falle der Studie der Maus) saugen muß um die HGE zu übertragen. Erst bei mehr als 36 h Saugzeit waren zwei Drittel der Versuchsmäuse (von 25) infiziert [2].

Eine Infektion des Menschen mit dem Erreger der Granulozytären Ehrlichiose, der eng verwandt ist mit *E. phagocytophila* und *E. equi*, kann eine Erkrankung (s.u.) verursachen, die in ihrem Verlauf, wie oben bereits angesprochen, der *E. chaffensis*-Infektion sehr ähnlich ist. Die Prävalenz und Inzidenz der HGE sind nicht bekannt. Sie dürften saisonal und regional starke Schwankungen zeigen. Die meisten Patienten (93,5 %) infizieren sich mit dem Erreger der HGE in den Monaten zwischen April und September wenn Zecken am aktivsten sind. Zwei Drittel der Infizierten leben in ländlichen Gebieten. Viele Patienten berichten von Zeckenstichen und Aufenthalt in freier Natur [35].

Eine typische klinische Manifestation umfasst Fieber, Kopfschmerzen und Myalgie, eventuell auch Übelkeit und Erbrechen. Oft wurde das Krankheitsbild als grippeähnlich beschrieben [9]. Bei etwa 75 % der Patienten mit HGE wurde eine milde renale Dysfunktion festgestellt. Relativ häufig waren die betroffenen Patienten verwirrt, was eine ZNS-Beteiligung wahrscheinlich werden ließ [4, 38, 41]. An veränderten Laborparametern treten häufig Leukopenie (oft mit Linksverschiebung), Thrombozytopenie, Anämie, und eine milde bis mäßige Erhöhung der Aspartat- und Alaninaminotransferase (GOT, GPT), der alkalischen Phosphatase (AP) und der Lactatdehydrogenase (LDH) auf [4, 27, 45]. Manche Patienten weisen Symptome oder laborchemische Veränderungen auf, die auf die Beteiligung eines bestimmten Organs hindeuten, wie zum Beispiel Husten, Lungeninfiltrate im Röntgenbild des Thorax, Gastroenteritis, akute abdominelle Schmerzen oder Meningitis [39].

Die Inkubationszeit beträgt 5,5 bis 11 Tage. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 45 und 60 Jahren, wobei Männer zweimal häufiger als Frauen erkranken. Die meisten Patienten sind akut krank und 17 bis 54 % werden in Krankenhäuser aufgenommen. Besonders schwere Erkrankungen, die eine intensive Therapie erforderlich machten, entwickelten sich laut einer Untersuchung bei 7 % der Patienten (bei etwa 150 erfaßten Fällen), dabei ereigneten sich vier Todesfälle [9]. Die Unspezifität und gelegentliche Dramatik der klinischen und labordiagnostischen Befunde bei der HGE haben zu vielen verschiedenen (Fehl-)Diagnosen geführt, unter anderem zu Folgenden: septischer Schock, Toxisches-Schock-Syndrom, maligne hämatologische

Erkrankungen, Virushepatitis oder Cholestase und Cholangitis [27]. Ein Hautausschlag zeigte sich nur bei wenigen Patienten (2% [5]). Die Letalitätsrate kann nicht genau angegeben werden, wird aber auf etwa 7-10 % geschätzt. Bei älteren Patienten kommt es häufiger zu schweren Verläufen und zum Tod. Die Todesursachen sind nicht in allen Fällen geklärt, doch wurden bei schweren oder tödlichen Verläufen gehäuft nosokomiale oder opportunistische Sekundärinfektionen gefunden. Unter anderem bakterielle und durch Pilze ausgelöste Pneumonien, generalisierte Candidosen, Candida-Ösophagitiden, Kryptokokken-Pneumonien und nekrotisierende Herpesösophagitis traten auf [36]. Diese Manifestationen, die bei schweren und tödlichen Verläufen beobachtet wurden, machen wahrscheinlich, daß der Erreger der HGE die Wirtsabwehr verändert und/oder stört. Gut bekannt ist aus der Veterinärmedizin, daß von *E. phagocytophila* infizierte Ziegen prädisponiert sind zur Entwicklung opportunistischer und sekundärer Infektionen. Diese Tiere entwickelten Defekte sowohl der T-Zell-vermittelten als auch der humoralen Immunität, außerdem Abnormitäten bzw. eine Verschlechterung in Adhärenz, Bakterizidie, phagozytären und migrativen Funktionen der neutrophilen Granulozyten. Außerdem wurde die Antikörperproduktion erniedrigt [4, 5].

Die Koinfektion mit dem Erreger der HGE und *Borrelia burgdorferi*, einem der Erreger der Lyme-Borreliose könnte zu besonders schweren Krankheitsverläufen führen [5, 35, 38]. Die Pathogenese der HGE ist jedoch bis jetzt nur wenig verstanden. Fest steht, daß Granulozyten die Zielzellen darstellen. Bei den infizierten Granulozyten wird die physiologische Halbwertszeit von 6-7 h deutlich verlängert und die Apoptose hinausgezögert. Dies scheint notwendig für die Proliferation des Erregers [53]. Immunhistologische Studien haben gezeigt, daß der Erreger fähig ist, eine Infektion vieler Organe auszulösen, solange dort nur eine geeignete Wirtszelle vorhanden ist. Die schwersten Organinfektionen konnten in der Leber, der Milz, dem Knochenmark und Lymphknoten gefunden werden. In der Lunge wurden interstitielle Pneumonie und alveoläre Schäden beobachtet.

### Diagnose:

Schwere Fälle und für Patienten und behandelnde Ärzte unbefriedigende klinische Verläufe könnten die Folge von mangelhafter Diagnosestellung und Therapie sein. Eine frühe Diagnose ist erforderlich für einen guten klinischen Verlauf. Existierende diagnostische und bestätigende Tests, die aber zum Teil nur in wenigen Labors angeboten werden, umfassen folgende Methoden: Blutbilduntersuchung (mit Differentialblutbild), Untersuchung peripherer Blutaussstriche auf Morulae in Granulozyten, Immunhistologie, PCR, Isolierung von Ehrlichien und serologische Bestimmung der hepatischen Transaminasen, der alkalischen Phosphatase und des C-reaktiven Proteins [1, 6, 7, 42]. Obwohl HGE-Infektionen in frühen Stadien durch Blutaussstriche mit Morulae beinhaltenden Granulozyten erkannt werden können, ist diese diagnostische Möglichkeit sehr aufwendig und ihre Sensitivität nicht genau bekannt. Ein negativer Blutaussstrich schließt keinesfalls die Infektion mit dem Erreger der HGE aus [6]. Eine direkte Anzucht der Ehrlichien in der Zellkultur ist zwar bereits gelungen, aber viel zu aufwendig und zu langsam für die Routinediagnostik [7]. Der Goldstandard der Diagnose von anderen Rickettsien-Infektionen ist der Nachweis der Serokonversion während der Rekonvaleszenz. Dieser Zeitpunkt ist allerdings zu spät für die HGE. Die vielversprechendste Methode ist die PCR, bei der durch Amplifikation von Nukleinsäuren der Ehrlichien aus dem peripheren Blut die Infektion nachgewiesen wird [34]. Die Spezifität dieser Methode scheint sehr hoch zu sein, wenn die geeigneten Kontrollen mitgeführt und Kontaminationen vermieden werden.

Wichtig ist in jedem Fall, daß die Humane Granulozytäre Ehrlichiose gedanklich in die Differentialdiagnose bei fieberhaften Erkrankungen unklarer Genese einbezogen wird [4, 26, 28, 29, 30, 37, 46].

### Therapie:

Zu Beginn der Entdeckung der HGE wurde die Infektion mit Doxycyclin, Tetracyclinen oder Chloramphenicol behandelt, wegen ihrer Ähnlichkeit zum Rocky Mountain spotted fever. Überwiegend hat diese Therapie auch Erfolg gezeigt, nur mehren sich die Berichte über die Ineffektivität des Chloramphenicols bzw. über Gefahren im Zusammenhang mit dessen

Anwendung. Seit bekannt ist, daß die Ehrlichiose bei Erwachsenen und auch Kindern sehr schwer oder tödlich verlaufen kann, scheint es sinnvoll Doxycyclin als Therapeutikum der Wahl auch bei Kindern zu empfehlen. Die empfohlene Therapie für Kinder und Erwachsene ist die orale oder intravenöse Gabe von Doxycyclin: 100 mg zweimal am Tag für Erwachsene oder 3 mg/(kg KG) pro Tag in zwei Dosen für Kinder. Die Gesamtdosis sollte für Kinder möglichst niedrig gehalten werden um Zahnverfärbungen vorzubeugen. Die Therapie mit Doxycyclin führt zu einer schnellen klinischen Verbesserung innerhalb von 48 Stunden. Eine Therapie bis drei Tage nach Besserung des Patientenzustandes mindestens aber für fünf bis sieben Tagen, hat sich als sinnvoll erwiesen. In-vitro-Versuche haben ergeben, daß Rifampicin ebenfalls wirksam ist, was für Tetrazyklin-allergische Patienten von Bedeutung ist. Von persistierenden Infektionen wurde bisher sehr selten berichtet, doch sollte wachsam geblieben werden, da eine solche Möglichkeit besteht. Es konnte Erreger-DNA bei Patienten noch 21 Tage nach dem Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden. Eine Persistenz von Serumantikörpern für mehr als 36 Monate bei behandelten Patienten, läßt eine lang andauernde antigene Stimulation auf einem niedrigen Level in diesen Fällen wahrscheinlich werden, nach anderen Quellen scheint das aber nicht die Regel zu sein [10, 30]. Bei den meisten Patienten mit einer kulturell gesicherten HGE-Infektion ließen sich in einer Studie Antikörper etwa zwei Wochen nach dem Beginn der Symptomatik nachweisen. Im Verlauf des ersten Monats zeigten die Antikörper-Titer ihren höchsten Wert und etwa die Hälfte der Patienten wiesen nach einem Jahr noch erhöhte Werte für HGE-Antikörper auf [54].

Vorbeugung für diese Erkrankung umfasst die Vermeidung einer Zecken-Exposition. Das heißt, dass bei Aufenthalt im Wald lange Hosen und feste Schuhe getragen werden sollten. Hellfarbige Kleidung kann helfen Zecken, die noch nicht gestochen haben, zu entdecken. Außerdem sollte eine sorgfältige Untersuchung des Körpers nach Zeckenexposition vor allem bei Kindern die Regel sein. Wird eine Zecke gefunden, sollte diese möglichst am Kopf mit einer Pinzette gefaßt und herausgezogen werden. Die betroffene Stelle sollte danach

desinfiziert werden. Eine Antibiotika-Prophylaxe in Gegenden in denen die HGE endemisch ist, wird nicht generell angeraten [3, 4, 33].

## 1.2. Borreliose – ein Überblick

Im Jahr 1974 häuften sich im US Staat Connecticut im Bezirk Lyme scheinbar die Fälle der juvenilen Polyarthrits. Eine Mutter deren Familie sehr stark betroffen war, sammelte Informationen über die Krankheitsgeschichten etlicher Patienten aus der Umgebung mit einem sehr ähnlichen Krankheitsbild. Damit gelangte sie schließlich an einen Arzt (Dr. A.C. Steere damals Yale Rheumatology Clinic) der diesen Übereinstimmungen nachging.

Nach und nach konnte der Erreger von W. Burgdorfer identifiziert werden, viele unterschiedliche Symptome und Manifestationen fanden ihren Ursprung in der Lyme-Krankheit, deren Verlauf in drei Stadien eingeteilt wurde.

Diese Einteilung erleichtert den Überblick über den komplexen Krankheitsverlauf, obwohl die Übergänge fließend sind und sich die Krankheit in jedem Stadium (erst-)manifestieren kann.

Eine Inkubationszeit ist nicht verbindlich festzulegen, sie kann bis zum Auftreten erster klinischer Zeichen Tage bis Jahre dauern.

Im folgenden ein Überblick über die Stadien der Erkrankung mit ihren vorherrschenden Symptomen:

### *Erstes Krankheitsstadium:*

Pathognomonisch für dieses Stadium ist das Erythema chronicum migrans (ECM), das im Durchschnitt Tage bis Wochen nach der Infektion auftreten kann. Eventuell, jedoch viel seltener, besteht die erste Hautmanifestation auch in einer Lymphadenosis cutis benigna (Borrelienlymphozytom). Unspezifische Allgemeinsymptome, die dieses Stadium leicht mit einer Grippe bzw. einem „Infekt“ verwechseln lassen, können sein: Fieber, Muskel-, Gelenk-, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, Abgeschlagenheit, Konjunktivitis, Pharyngitis, Begleitbronchitis, regionale Lymphadenitis. Allerdings finden sich diese Symptome bei weniger als 10 % der Patienten mit ECM [12].

Serologisch können meist noch keine Antikörper nachgewiesen werden, so daß sich die Diagnose auf den klinischen Befund beschränkt.

*Zweites Krankheitsstadium:*

Wochen bis Monate nach einem *Erythema chronicum migrans* kommt es zu Infektionen anderer Organe, die das zweite Stadium charakterisieren. Eine Bakteriämie ist dazu Voraussetzung. Eventuell breitet sich der Erreger auch auf lymphatischem Weg oder entlang von Nervenfasern aus. Es kommt vor allem zu einer „aseptischen Meningitis“ und peripheren Nervenentzündungen unter Beteiligung sensibler und/oder motorischer Fasern. Es kann eine Di- oder Tetraplegiesymptomatik einsetzen, die eine Beteiligung des Rückenmarks erkennen läßt (Radikulomyelitis). Das klinische Bild kann vieldeutig sein, es tritt jedoch meist als Bannwarth-Syndrom (Meningopolyneuritis) in Erscheinung. Häufig ist eine Fazialisparese zu beobachten, die fast als Leitsymptom dieses Stadiums bezeichnet werden kann.

Andere Prädilektionsorgane sind das Herz (Endo-, Myo-, Peri-, Pankarditis), seltener das Auge (Uveitits, Konjunktivitis, Chorioretinitis, Iridozyklitis, Panophtalmitis), Leber (Transaminasenerhöhung), Niere, Lunge, Muskel, Milz und andere Organe. In diesem Stadium ist die Serodiagnostik in der Regel zuverlässig, da eine humorale Immunantwort bereits voll ausgebildet ist.

*Drittes Krankheitsstadium:*

Etwa drei Monate nach dem ECM geht die Krankheit in das dritte Stadium über. Allerdings kann sich dieses auch noch nach Jahren oder unter Umgehung der ersten beiden Stadien klinisch manifestieren. Hierbei können Gelenke, Haut und das ZNS befallen sein.

Arthritis vorwiegend der Knie- und Sprunggelenke, chronische Hautentzündungen (Acrodermatitis chronica atrophicans), Enzephalomyelitis sind nur einige Erkrankungen des dritten Stadiums [11, 12].

In den USA sind die meisten vectorübertragenen Krankheiten auf Zecken zurückzuführen. Generell haben dort zeckenübertragene Erkrankungen in den letzten 25 Jahren immer weiter zugenommen, sei es weil mehr Menschen in ländliche Gebiete gezogen sind und damit das Risiko von Zeckenstichen für

diese Personen höher geworden ist, oder wegen der verstärkten Freizeitaktivität im Freien [25, 31, 32, 37, 43].

## 2. ZIELSETZUNG

Die Lyme-Borreliose ist eine der wichtigsten und bekanntesten von Zecken übertragenen Erkrankungen. In dieser Arbeit wurden Seren von Patienten untersucht die sich mit ihr infiziert hatten. Bei diesen Patienten konnte davon ausgegangen werden, daß sie von einer (oder mehreren) Zecken gestochen worden waren. Das heißt sie waren mit dem Vektor in Kontakt gekommen, der auch die HGE überträgt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, wieviele Patienten im Raum Unterfranken, die Antikörper gegen die Erreger der Lyme-Borreliose in ihrem Blut hatten, auch Antikörper gegen den Erreger der HGE aufwiesen. Patienten bei denen das der Fall war, könnten zum Teil von einer Zecke mit den Erregern der Lyme-Borreliose und der HGE infiziert worden sein. Beide Infektionen können völlig asymptomatisch verlaufen, der Patient hätte in diesem Fall von keiner der beiden Infektionen etwas bemerkt. Es könnte aber auch sein, daß der Patient scheinbar nur an der Lyme-Borreliose erkrankt war und demzufolge auch nur in Hinblick auf diese Krankheit therapiert wurde. In manchen Fällen mag die Borreliose unerwartet schwer verlaufen sein und es war nicht bekannt, daß der Patient mit der HGE koinfiziert war und daß diese Koinfektion den Krankheitsverlauf erschwert hatte. Es sollte festgestellt werden, wieviel Prozent der Patienten positive Antikörpertiter gegen beide Erreger aufwiesen und damit im Raum Unterfranken die Aufmerksamkeit für diese „neue“ zeckenübertragene Erkrankung geweckt werden, welche die Ursache einer besonders schwer verlaufenden Borreliose oder einer sogenannten „seronegativen“ Borreliose sein kann. Dem Patientenkollektiv mit Antikörpern gegen Borrelien wurde ein Kollektiv gesunder Blutspender gegenübergestellt, um herauszufinden, ob die Seroprävalenz signifikante Unterschiede zeigt zu einem sicher von Zecken gestochenen Kollektiv.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Patientenserum

Im Rahmen der Arbeit wurden 239 Seren von Patienten getestet, die Antikörper gegen Borrelien aufwiesen. Als Kontrollkollektiv wurden 263 Seren von gesunden Blutspendern gewählt.

Die Ersteren stammten von Patienten, die zur ambulanten oder stationären Behandlung in den Jahren 1996-1998 in die dermatologische Universitätsklinik Würzburg kamen. Aufgrund der klinischen Symptomatik dieser Patienten wurde die Überprüfung der Antikörpertiter gegen Borrelien von ärztlicher Seite verordnet. Diese Seren wurden nach ihrer damaligen Testung auf eine Borrelieninfektion bei  $-18\text{ °C}$  eingefroren.

Drei labordiagnostische Testverfahren kamen zur Anwendung: Immunfluoreszenztest (IFT), Westernblot (WB), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Sowohl auf IgG- als auch auf IgM- Antikörper wurde nach folgendem Schema getestet, wobei die Testmethoden spezifisch für Antikörper gegen die drei Borrelienarten *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* waren:

Zuerst wurde ein ELISA durchgeführt. Ergab dieser ein negatives Ergebnis, wurde dieses Serum als negativ gewertet, d. h. als ein Serum ohne Antikörpertiter gegen Borrelien. Ergab der ELISA ein positives Ergebnis, wurde dieses mittels IFT überprüft. War dieser Test ebenfalls positiv, wurde das Serum als positiv gewertet. Wenn der ELISA eingeschränkt positiv ausfiel und der IFT war positiv, wurde dieses Serum als positiv gewertet, war der ELISA positiv und der IFT eingeschränkt positiv, ebenfalls. Fiel der IFT jedoch negativ aus, wurde mittels des WB noch einmal gegengetestet. Wie dieses Ergebnis ausfiel, so wurde das Serum gewertet.

Für diese Arbeit wurden nur die Seren zur Überprüfung auf Antikörper gegen Ehrlichien ausgewählt, die in mindestens zwei der drei geschilderten Testverfahren positive IgG-Titer aufwiesen. Ein IgM-Titer war nicht zwingend erforderlich.

Eingefroren wurden die Seren in 1,8 ml-Kryoröhrchen (NUNC).

### 3.1.2. Seren der Blutspender

Als Kontrollkollektiv wurden 263 Seren von Vollblutspendern der Transfusionsmedizin der Universität Würzburg gewählt. Von diesen Spendern wurde jeweils ein 10 ml-Serumröhrchen abgenommen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 2500 U/min wurde das Serum mittels eines Serumfilters (Sarstedt) von dem geronnenen Blut getrennt und nach Beschriftung in obengenannten Kryoröhrchen bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.1.3. Inhaltsstoffe des IgG-Immunfluoreszenztests

Der Immunfluoreszenztest (HGE IFA IgM/IgG) der in dieser Arbeit zur Anwendung kam, wird hergestellt von der amerikanischen Firma MRL Diagnostics und wird in Deutschland vertrieben von der Firma Genzyme Virotech. Er beinhaltet folgende Reagenzien und Objektträger:

- zehn Objektträger mit je acht Vertiefungen, die mit Bakterienaggregaten (Morulae) aus HGE-1 infizierten HL60-Zellen beschichtet sind
- IgG-Konjugat (2,5 ml) bestehend aus gereinigten und fluorescingekoppelten Ziegenantikörpern und dem Farbstoff Evan's Blau
- IgG-Positivkontrolle aus menschlichem Serum (0,3 ml)
- Negativkontrolle aus menschlichem Serum (0,25 ml)
- Eindeckmedium (2,5 ml) zur Fixierung der Deckgläschen auf den Objektträgern
- PBS-Pulver (phosphate buffered saline) zur Lösung in einem Liter destilliertem Wasser (ergibt einen 0,01 M-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 )
- Plastik-Tropfhilfe für das Konjugat

### 3.1.4. Inhaltsstoffe des IgM-Immunfluoreszenztests

- zehn Objektträger mit je acht Vertiefungen, die mit Bakterienaggregaten (Morulae) aus HGE-1 infizierten HL60-Zellen beschichtet sind
- IgM-Konjugat, lyophilisiert, zur Lösung in 2,5 ml destilliertem Wasser, bestehend aus gereinigten und fluorescein-gekoppelten Ziegenantikörpern und dem Farbstoff Evan's Blau
- IgM-Positivkontrolle aus menschlichem Serum (0,3 ml)
- Negativkontrolle aus menschlichem Serum (0,25 ml)
- IgM-Pretreatment(Vorbehandlungs)-Lösung (12 ml) bestehend aus PBS mit monospezifischem Ziegen-Antiserum
- Eindeckmedium (2,5 ml) zur Fixierung der Deckgläschen auf den Objektträgern
- PBS-Pulver (s.o.)
- Plastik-Tropfhilfe für das Konjugat

### 3.1.5. Reagenzien

#### 3.1.5.1. DNA-Extraktion

- Qiagen DNA Mini-Kit
- H<sub>2</sub>O, steril, entmineralisiert (Fresenius)
- Ethanol abs. (Baker)
- PBS (MRL Diagnostics)

#### 3.1.5.2. Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

- Primer-Oligonukleotide (MWG-Biotech)
  - Ehr 521*      5' - TGT AGG CGG TTC GGT AAG TTA 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'
  - GER 3*        5' - TAG ATC CTT AAC GGA AGG GCG – 3'

*GER 4* 5' - AAG TGC CCG GCT TAA CCC GCT GGC – 3'

- PCR Master (Roche) mit PCR-Puffer, Taq-Polymerase, Nukleotiden, H<sub>2</sub>O

### 3.1.5.3. Agarose-Gelelektrophorese

- Agarose (Seakem)
- 10x TAE-Buffer (Gibco BRL)
- Ladepuffer (Loading Dye)
  - 0,1 g Bromphenolblau (Sigma)
  - 0,1 g Xylenecyanol (Sigma)
  - 16,75 g Saccharose (Sigma)
  - H<sub>2</sub>O ad 25 ml (Fresenius)
- Ethidiumbromid 1%ig (Sigma)
- DNS-Längenstandard VIII (Boehringer Mannheim) mit Ladepuffer und H<sub>2</sub>O  
vermischt:
  - 200 µl Standard (bei einer Konzentration von 0,25 µg/ µl)
  - 250 µl H<sub>2</sub>O
  - 80 µl Ladepuffer

### 3.1.6. Geräte und Zubehör

- Zentrifugen (Hettich, Mikroliter; Hermle)
- Inkubationsschrank 35-37 °C (Heraeus Instruments)
- Kühlschrank 2-8 °C (Genheimer)
- Plastikflasche zum Waschen der Objektträger (Hartenstein)
- Geeichte Pipetten (Eppendorf)
- Färbeküvetten (Duran) zum Abwaschen des Serums und des Konjugats
- Ein-Liter-Messzylinder (Schott)
- Feuchte Kammer zum Inkubieren (Waca)
- Stoppuhr (Hartenstein)
- Fluoreszenzmikroskop „Orthoplan“ (Leitz)
- Schüttler (Edmund Bühler, KS 10)
- Vortex (Bender & Hobein AG, Vortex Genie 2)

- Thermomixer (Eppendorf)
- Abzug (Heraeus)
- Netzteil (Biometra)
- Gelkammer (Hartenstein)
- PCR-Cycler (Perkin Elmer GeneAmp)
- Photoapparat (Polaroid)
- UV-Bank (Hartenstein)

### **3.1.7. Verbrauchsmaterial**

- Deckgläschen 24 x 60 mm (Knittel-Gläser)
- Reaktionsgefäße 0,2 ml (Perkin Elmer), 1,5 ml (Greiner), 2 ml (Sarstedt)
- Pipettenspitzen, autoklaviert und gestopft (Eppendorf)
- Destilliertes Wasser (Fresenius)
- Saugpapier (Schleicher & Schuell)
- Serumfilter (Sarstedt)
- Kryoröhrchen (Brand)
- Polaroidfilme (Polaroid 667)
- Einweg-Plastikpipetten (Copan)

## **3.2. Methode**

### **3.2.1. Testprinzip**

Der Immunfluoreszenztest der in der Arbeit verwendet wurde, beruht auf folgendem Prinzip:

Im ersten Schritt wurde das verdünnte Patientenserum auf das Feld eines speziellen Objekträgers aufgebracht, dessen Testfelder mit Humanen Granulozytären Ehrlichien in Form von Morulae als Antigen beschichtet waren. Diese waren aus HGE1-infizierten HL60-Zellen isoliert worden, einer menschlichen Leukämiezelllinie. Nach einer Inkubationszeit – eventuell im Serum vorhandene Antikörper hatten jetzt an das Antigen gebunden – wurde das Patientenserum abgewaschen. Im zweiten Schritt wurde ein Fluorescin-

gekoppelter Antikörper der an menschliche Antikörper bindet, aufgebracht. Nach wiederholtem Inkubieren und nochmaligem Waschen wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Dieses Grundprinzip war für beide Testkits (IgM und IgG) identisch. Bei dem Test für IgM-Antikörper wurde das Patientenserum zusätzlich noch mit einer Pretreatment-Diluent behandelt. Diese enthielt monospezifische Ziegenantikörper, welche mit humanen IgG-Antikörpern Komplexe bilden, die dann abzentrifugiert werden konnten.

### **3.2.1.1. IgG-Immunfluoreszenztest**

Nach Beschriftung des Reaktionsgefäßes wurden 315 µl PBS hineinpipettiert. Pro Serum war ein Reaktionsgefäß erforderlich. Von dem zu testenden Serum (aufgetaut und an die Raumtemperatur angeglichen) wurden 5 µl zu den 315 µl PBS pipettiert und gründlich gemixt. Daraus resultierte ein Verdünnung des Patientenserums auf 1:64.

Von dieser Verdünnung wurden 25 µl auf eine der Vertiefungen des Objektträgers aufgebracht.

Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit bei 35-37 °C in einer feuchten Kammer, wurde die Serumverdünnung mit PBS abgewaschen und der Objektträger 10 min in eine mit PBS gefüllte Färbeküvette gestellt (auf einer Schüttelplatte bei etwa 50 U/min).

Danach wurde der Objektträger aus dem PBS genommen und kurz in destilliertes Wasser getaucht.

Überschüssiges Wasser auf dem Objektträger wurde mit Saugpapier abgetupft und der Objektträger an der Luft getrocknet, bis das Feld vollständig abgetrocknet war (15-20 min).

Nun wurden auf die Vertiefung 25 µl des IgG-Konjugats aufgebracht und wiederum 30 min bei 35-37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach nochmaligem Waschen und Trocknen wie oben wurde der Objektträger mit dem Eindeckmedium und einem Deckgläschen eingedeckt, und konnte nun unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden.

Sowohl je 25 µl der verschiedenen Verdünnungen der Positivkontrolle ( 1:4; 1:8; 1:16) und 25 µl der Negativkontrolle wurden bei jedem Testlauf mitgeführt [21, 28].

### **3.2.1.2. IgM-Immunfluoreszenztest**

Dieser Test lief prinzipiell nahezu identisch wie der IFT für IgG-Antikörper ab. Jedoch kam hier zusätzlich eine Pretreatment-Diluent (Vorbehandlungslösung) zur Anwendung. Diese Lösung bestand aus Ziegenantikörpern gegen menschliches IgG und sollte verhindern, daß das Ergebnis durch IgG-Antikörper verfälscht wurde.

Nach Beschriftung des Reaktionsgefäßes wurden 95 µl des Pretreatment-Diluent hineinpipettiert.

Nun wurden 5 µl des Serums (ebenfalls aufgetaut und an die Raumtemperatur angeglichen) hinzupipettiert. Daraus resultierte eine Verdünnung von 1:20.

Nach Mischen und einer Reaktionszeit von wenigstens fünf Minuten um die Ziegenantikörper an die humanen IgG-Antikörper binden zu lassen, wurde das Reaktionsgefäß bei 15 000 U/min 10 Minuten zentrifugiert um die Antigen-Antikörper-Komplexe abzutrennen.

Nun wurden 25 µl des Überstandes auf eine der Vertiefungen des Objektträgers pipettiert und 90 min bei 35-37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Jetzt wurde der Objektträger mit PBS aus einer Plastikspritzflasche gewaschen und danach 10 min in eine PBS enthaltende Färbeküvette gestellt.

Nun wurde er kurz in destilliertes Wasser getaucht und, nach dem Abtupfen überschüssigen Wassers mit Saugpapier, an der Luft getrocknet.

Wenn das Feld abgetrocknet war, konnten 25 µl IgM-Konjugat daraufpipettiert werden.

Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 35-37 °C in einer feuchten Kammer wurde wiederum wie oben gewaschen, in destilliertes Wasser getaucht und trocknen gelassen.

Der Objektträger wurde nun mit Hilfe der Eindecklösung und eines Deckgläschens eingedeckt und bis zu seiner Auswertung unter dem Immunfluoreszenzmikroskop in einer lichtdichten Mappe gelagert. Die Auswertung wurde innerhalb der nächsten zwei Stunden vorgenommen.

Auch bei diesem Test wurden je 25 µl der verschiedenen Verdünnungen der Positivkontrolle (1:4; 1:8; 1:16) sowie 25 µl der Negativkontrolle mitgeführt [21, 28].

### 3.2.2. Auswertung des Immunfluoreszenztests

Der Immunfluoreszenztest wurde bei einer maximalen Vergrößerung von 400fach ausgewertet.

Vor der Auswertung der Objektträger wurden jeweils die Positiv- und Negativkontrollen sorgfältig betrachtet: Bei der Positivkontrolle mußte je nach Verdünnung eine „apfelgrüne“ Fluoreszenz der Morulae sichtbar werden, die bei einer Verdünnung von 1:8 als eingeschränkt positiv zu definieren war. Die Negativkontrolle durfte überhaupt nicht fluoreszieren.

Die Intensität der Fluoreszenz der ausgewerteten Seren wurde in drei Stufen eingeteilt:

+	Positiv: Eindeutige, mäßige bis intensive Fluoreszenz
(+)	Eingeschränkt positiv: Vorhandene aber schwache Fluoreszenz
-	Negativ: Keine Fluoreszenz

Tabelle 2

### 3.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

#### 3.2.3.1. Beschreibung der PCR

Die Polymerase-Ketten(Chain)-Reaktion ist eine molekulargenetische Methode, die von Henry A. Erlich, Kary Mullis und Randall K. Saiki bei der Cetus Corporation/USA entwickelt und benannt wurde [48, 49].

Das Prinzip der PCR basiert auf einer enzymatischen Amplifikation von DNA-Fragmenten, die durch zwei Oligonukleotid-Primer flankiert werden. Diese Oligonukleotide binden an die jeweils gegenüberliegenden Enden der Zielsequenzen, indem sie mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen. Sie dienen auf diese Weise als Primer für die Neusynthese der dazwischenliegenden DNA-Sequenz. Wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung, Bindung der Primer an die komplementären Sequenzen (Hybridisierung) und DNA-Synthese durch Verlängerung der gebundenen Primer mit Hilfe einer DNA-Polymerase (Elongation) führen zur Vervielfältigung des Segments, das durch die 5'-Enden der Primer begrenzt ist. Die Synthese des neuen DNA-Stranges erfolgt dabei grundsätzlich in 3'-Richtung.

Da jedes neusynthetisierte DNA-Segment seinerseits eine Oligonukleotid-Zielsequenz besitzt, können die im Überschuß vorliegenden Primer auch an jeden neuen DNA-Strang binden, so dass sich nach jedem Zyklus die Anzahl an spezifischen DNA-Fragmenten gegenüber dem Vorhergehenden verdoppelt. Daraus resultiert die exponentielle Anreicherung des durch das Primer-Paar definierten DNA-Fragmentes, was zu einer millionenfachen Amplifikation in kurzer Zeit führt.

Durch die Verwendung einer thermostabilen Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* [50] wird diese während der Hitzedenaturierung nicht inaktiviert und muß daher nicht bei jedem Zyklus neu zugegeben werden. Hierdurch wurde die Grundlage einer automatisierten DNA-Amplifikation mittels eines PCR-Gerätes geschaffen.

### 3.2.3.2. Vorsichtsmaßnahmen

Bei allen Versuchen wurden die in der Literatur vorgeschlagenen Vorsichtsmaßnahmen [51] eingehalten, um eine Kontamination mit Fremd-DNA weitestgehend auszuschließen.

Der PCR-Ansatz und die DNA-Extraktion fanden jeweils in einem anderen Raum als die PCR-Reaktion (Amplifikation) und die Gelelektrophorese statt. Ebenso wurden die jeweils benötigten Reagenzien und Geräte in getrennten Räumen aufbewahrt.

Alle für den PCR-Ansatz benötigten Reagenzien wurden in einem PCR-Produkt-freien Raum in kleine, für den Einmalgebrauch bestimmte Mengen aliquotiert. Es wurden sogenannte „positive displacement pipettes“ mit autoklavierten Einweg-Pipettenspitzen, die wiederum mit hydrophoben Filtern versehen waren, benutzt. Um ein Verspritzen der Reagenzgemische beim Öffnen der Reaktionsgefäße zu vermeiden, wurden sie vor jedem Öffnen mittels einer Mikroliterzentrifuge zentrifugiert.

Die DNA wurde dem PCR-Ansatz zuletzt zugegeben, um einer Kreuz-Kontamination mit DNA aus anderen Proben vorzubeugen; auch die aliquotierten DNA-Proben wurden vor jedem Gebrauch aus oben genanntem Grund zunächst zentrifugiert.

Während des Versuchsansatzes wurden die Einmalhandschuhe mehrfach, insbesondere nach Umgang mit DNA-haltigen Proben, gewechselt.

### 3.2.3.3. Isolierung von HGE-DNA

Die benötigte ehrlichäre DNA extrahierten wir aus den Bakterienaggregaten die auf die Testfelder der Objektträger des Immunfluoreszenztestes aufgebracht waren.

Aus den Ehrlichien wurde die DNA mit dem Qiagen Tissue Kit extrahiert.

Die Morulae wurden mit der Pipettenspitze abgespült und mit PBS in Lösung genommen (zweimal 10 µl pro Testfeld). Das PBS-Ehrlichien-Gemisch (insgesamt 160 µl bei acht Testfeldern plus zusätzlich 40 µl PBS) wurde mit

Proteinase K (20 µl) und AL-Puffer (200µl) versetzt und gemischt. Nach Inkubieren (10 min bei 56 °C) wurde Ethanol abs. (200µl) dazugegeben und der gesamte Ansatz in eine Qiagen Spin Column überführt. Nach Zentrifugieren (1 min bei 8000 rpm), Waschen mit AW1-Puffer (500µl), wiederholtem Zentrifugieren (1 min bei 8000 rpm) und nochmaligem Waschen mit AW2-Puffer (500 µl), wurde wiederum zentrifugiert (3 min 14000 rpm). Nach dem Waschen wurde jeweils ein neues Collecting Tube verwandt. Nach weiterem Abzentrifugieren ohne Puffer (1 min 14000 rpm) wurde AE-Puffer zugegeben (200 µl) und nach kurzer Inkubationszeit bei Raumtemperatur (1 min) die extrahierte DNA eluiert (1 min bei 8000 rpm). Das Eluat wurde aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

#### **3.2.3.4. Vorbereitung der Proben (PCR-Ansatz)**

Wegen der hohen Kontaminationsanfälligkeit der PCR fanden die folgenden Arbeitsschritte in verschiedenen Räumen statt. Die für den Probenansatz erforderlichen Geräte wurden ausschließlich für die PCR verwendet. Die für die erfolgreiche Amplifikation benötigte Menge der HGE-DNA wurde durch Testläufe ermittelt und es zeigte sich, dass 0,5 µl der Positivkontrolle ausreichend für die Amplifikation waren und das PCR-Produkt eine deutliche Bande in der Agarose-Gelelektrophorese zeigte.

Amplifikationsansatz:

DNA (0,5 µl der Positivkontrolle)

Je 0,5 µl Primer (=12,5 pmol)

25 µl PCR-Mix

H<sub>2</sub>O ad 50µl Gesamtvolumen

### 3.2.3.5. Protokoll der PCR mit GER3/4-Primern

Goodman et al. erarbeiteten folgendes Protokoll zur Amplifikation von ehrlichiärer DNA [7]:

Mit Hilfe der Primer GER3 (5' TAGATCCTTAACGGAAGGGCG 3') und GER4 (5' AAGTGCCCGGCTTAACCCGCTGGC 3') wird ein 151 bp langes DNA-Fragment des Erregers der HGE vervielfacht.

Die Amplifikation erfolgte in einem PCR-Cycler:

	5 min Denaturation bei 95 °C
40 Zyklen	1 min Denaturation bei 94 °C
	1 min Hybridisierung bei 50 °C
	1 min Elongation bei 72 °C (im vierzigsten Zyklus 7 min)
	Kühlung bei 4 °C

Tabelle 3

### 3.2.3.6. Protokoll der PCR mit EHR 521/747-Primern

Um eine Nested PCR durchzuführen (s.u.) wurde die PCR mit dem folgendem Protokoll etabliert. Das Amplifikat dieses Protokoll ist groß genug um einen kleineren Ausschnitt desselben noch einmal zu vervielfältigen.

Mit dem Protokoll von Pancholi et al. wird ein DNA-Fragment mit einer Länge von 247 bp amplifiziert [35]. Die Primer EHR 521 (5' TGTAGGCGGTTCCGGTAAGTTAAAG 3') und EHR 747 (5' GCACTCATCGTTTACAGCGTG 3') flankieren dabei einen Abschnitt der 16S rRNA des Erregers der Humanen Granulozytären Ehrlichiose. Das Programm für den Cycler war folgendes:

	4 min Denaturation bei 94 °C
40 Zyklen	45 sec Denaturation bei 94 °C
	45 sec Hybridisieren bei 60 °C
	45 sec Elongation bei 72 °C (im vierzigsten Zyklus 5 min)
	Kühlung bei 4°C

Tabelle 4

### 3.2.3.7. Nested PCR

Ein DNA-Fragment des PCR-Produktes, das mit den Primern EHR 521/747 gewonnen wurde, konnte mit Hilfe der Primer EHR 552/706 und der Methode der Nested PCR ein weiteres Mal amplifiziert werden: Dabei wurde im ersten PCR-Ansatz mit äußeren Primern (EHR 521/747) ein DNA-Fragment vervielfältigt (s.o.), und im zweiten Schritt (der Nested PCR) ein Stück von diesem PCR-Produkt mit inneren Primern amplifiziert. Diese inneren Primer waren EHR 552 (5´ -GCCAGGGCTTAACCCTGGAGC- 3´) und EHR 706 (5´ -TCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC- 3´). Mit dieser Methode wurde nachgewiesen, dass mit der PCR das gesuchte DNA-Fragment und nicht etwa ein ähnliches anderes vervielfältigt wurde. Der Ansatz für die Nested PCR war folgender:

0,5-2 µl PCR-Produkt (der PCR mit Primern EHR 521/747)

Je 0,5 µl Primer (EHR 552/706)

25 µl PCR-Mix

H<sub>2</sub>O ad 50 µl Gesamtvolumen

Das Cycling-Protokoll war identisch mit dem für die Primer EHR 521/747.

### 3.2.3.8. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 1,8 %igen Agarosegels wurden 0,9 g Agarose und 50 ml TAE-Puffer in einen Glaskolben gegeben und in einem Mikrowellengerät durch mehrmaliges Aufkochen und Umrühren homogenisiert.

Die noch warme flüssige Agarose wurde für die spätere DNA-Markierung mit 2,5 µl Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff der stabile Bindungen mit DNA-Basen eingeht, versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit TAE-Puffer bedeckt. Je 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl Ladepuffer (Loading Dye) vermischt und in eine Geltasche pipettiert. Um die Größe des DNA-Fragmentes abschätzen zu können, wurde zu beiden Seiten der PCR-Produkte 3 µl eines DNA-Standard(VIII)/H<sub>2</sub>O/Ladepuffer-Gemisches in die Geltaschen pipettiert. Die Gelkammer wurde an Gleichstrom mit 80 V und 150 mA 50 min lang angeschlossen.

Nach dieser Zeit hatten sich die verschiedenen DNA-Fragmente des Standards aufgeteilt und ließen die ungefähre Größe des PCR-Amplifikats erkennen.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Ergebnisse der Seroprävalenzstudie

Aus der Auswertung des Immunfluoreszenztests ergaben sich folgende Resultate:

Bei 10 (4,18 %) der getesteten Patienten mit Antikörpern gegen Borrelien konnten IgG-Antikörper gegen Ehrlichien nachgewiesen werden, zusätzlich wurden 7 (2,93 %) als eingeschränkt positiv bewertet.

15 (6,28 %) Seren enthielten eindeutig IgM-Antikörper, 3 (1,26 %) wurden als eingeschränkt positiv bewertet.

Von den Blutspendern hatten 4 (1,52 %) IgG-Antikörper in ihrem Serum und 2 (0,76 %) waren eingeschränkt positiv. Ein Serum wies (0,38 %) IgM-Antikörper auf, und ein weiteres (0,38 %) wurde als grenzwertig positiv befundet:

Antikörper gegen den Erreger der HGE	Patienten mit Antikörpern gegen Borrelien n=239	Blutspender n=263
<b>IgG +</b>	10 (4,18 %)	4 (1,52 %)
<b>IgM +</b>	15 (6,28 %)	1 (0,38 %)
<b>Nur IgG +</b>	7 (2,93 %)	3 (1,14 %)
<b>Nur IgM +</b>	10 (4,18 %)	1 (0,38 %)
<b>IgG + und IgM +</b>	3 (1,26 %)	
<b>IgG (+)</b>	7 (2,93 %)	2 (0,76 %)
<b>IgM (+)</b>	3 (1,26 %)	1 (0,38 %)

Tabelle 5

Mittels ELISA/ Westernblot/ Immunfluoreszenztest wurden die Seren der HGE-positiven Blutspender auf Antikörper gegen Borrelien überprüft. Dabei ergab sich folgendes Resultat: Von den vier IgG-positiven Blutspendern, wiesen zwei IgG-Antikörper gegen Borrelien auf, einer davon auch IgM-Antikörper. Der IgM-positive (gegen den Erreger der HGE) Blutspender hatte keine Antikörper gegen Borrelien in seinem Serum.

Antikörper gegen Borrelien	Antikörper gegen den Erreger der HGE	
	IgG + (4)	IgM + (1)
IgG +	2	Keine Antikörper
IgM +	1 (einer von den zwei IgG – positiven)	Keine Antikörper

Tabelle 6

*Statistik:*

Bei dem Vergleich der beiden Kollektive (Borreliosepositive und Blutspender) ergab der exakte Test nach Fisher (2-seitig) für den Vergleich der Häufigkeit des Auftretens positiver IgG-Antikörper  $p = 0,10$  und für IgM-Antikörper  $p < 0,0001$ .

**4.2. Ergebnis der PCR und Nested PCR**

Mit der PCR/Nested PCR liegt ein sehr sensitives Verfahren zum Nachweis von ehrlichärer DNA in Granulozyten vor. Die beschriebenen Protokolle konnten etabliert werden und sind einer weitergehenden Nutzung in diesem Labor zugänglich gemacht worden. Diese war aber nur Teil der vorliegenden Arbeit. Aus der Auswertung der Agarose-Gelelektrophorese geht hervor, dass ein Fragment (247 bp bzw 151 bp) amplifiziert wurde.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Vergleich publizierter Daten mit eigenen Ergebnissen

Zum Thema der Seroprävalenz der HGE beziehungsweise der Koinfektion mit Borrelien in verschiedenen Populationen, wurden bis jetzt nur wenige Studien publiziert. Die Seroprävalenzraten für die HGE differieren dabei zum Teil erheblich. Diese Abweichungen sind sicher nicht nur auf tatsächlich vorhandene unterschiedliche Prävalenzen zurückzuführen, sondern in geringem Maße auch auf Meßungenauigkeiten und die Tatsache, daß in manchen Studien nicht mit humanen granulozytären Ehrlichien als Antigen für den Immunfluoreszenztest gearbeitet wurde, sondern mit verwandten Erregern. Außerdem wurde zum Teil nicht getrennt auf IgG- und IgM-Antikörper getestet. Dennoch sei unbestritten, daß gerade in den Vereinigten Staaten, wo sowohl die HGE als auch die Lyme-Borreliose „entdeckt“ wurden, zum Teil beachtlich hohe Seroprävalenzraten in ländlichen Gebieten nachweisbar sind [13].

In der Studie von **Mitchell et al.** [14] wurden Patienten untersucht, die an der Lyme-Borreliose, der HGE oder der Babesiose (verursacht durch *Babesia microti*) erkrankt waren. Babesien sind Protozoen, die vor allem aus dem Tierreich bekannt sind, die aber auch bei immungeschwächten beziehungsweise splenektomierten Patienten nachgewiesen wurden. Sie befallen als sehr kleine Ringformen Erythrozyten.

Ziel der Studie war es, herauszufinden, wie viele Patienten mit der gesicherten Diagnose einer der obengenannten Erkrankungen auch mit einem der beiden anderen Erreger koinfiziert worden waren.

Die Autorengruppe fand heraus, daß von 96 Patienten mit Lyme-Borreliose neun koinfiziert waren: fünf (5,2 %) mit dem Erreger der HGE, zwei (2,1 %) mit *B. microti* und zwei (2,1 %) mit beiden Erregern. Von 19 Patienten mit HGE waren drei (15,8 %) koinfiziert: einer (5,3 %) mit *B. burgdorferi*, einer (5,3 %) mit *B. microti* und einer (5,3 %) mit beiden Erregern. Ein Patient mit Babesiose war auch seropositiv für die HGE.

	B. burgdorferi – Antikörper	HGE – Antikörper	B.microti – Antikörper	Koinfektion (HGE –und Babesien – Antikörper)
<b>Patienten mit Lyme-Borreliose n=96</b>	96 (100 %)	5 (5,2 %)	2 (2,1 %)	2 (2,1 %)
<b>Patienten mit HGE n=19</b>	1 (5,3 %)	15 (100 %)	1 (5,3 %)	1 (5,3 %)
<b>Patient mit Babesiose n=1</b>	0	1 (100 %)	1 (100 %)	

Tabelle 7

Das Vorhandensein solcher Koinfektionen könnte auch ein Grund dafür sein, daß es zu derart variablen Manifestationen bei Patienten mit Lyme-Borreliose, Babesiose und Ehrlichiose kommen kann. Daher sollten bei Verdacht auf eine dieser Erkrankungen die anderen durch serologische Test ausgeschlossen werden [14].

In dieser Studie wurde unter anderem mit einem Immunfluoreszenztest gearbeitet, dessen Testfelder mit *Ehrlichia equi*-Antigen beschichtet waren. Dieser Erreger gehört ebenfalls zur Phagocytophila-Genogruppe (s.o.) und es wurde nachgewiesen, daß *E. equi*, *E. phagocytophila* und humane granulozytäre Ehrlichien sehr ähnlich bis identisch sind, so daß eine nahezu vollkommene Kreuzreaktivität der Antikörper gegen diese Erreger besteht [18]. Von den 19 Patienten mit HGE konnten bei 10 (52,6 %) im peripheren Blutaussstrich zytoplasmatische Morulae in polymorphnukleären Leukozyten nachgewiesen werden.

Es wurde hier nicht getrennt auf IgG- und IgM-Antikörper getestet. Die Seroprävalenzrate für die HGE bei Patienten aus Wisconsin mit Borrelienantikörpern wurde von Mitchell et al. mit 5,2 % angegeben.

**Bakken et al.** untersuchten in ihrer Studie [15] die Seroprävalenz der HGE in Norwegen. Patienten mit akuter Lyme-Borreliose wurden auf Antikörper gegen den Erreger der HGE getestet. Dabei stellte sich heraus, daß 10,3 % der Patienten auch Antikörper gegen den Erreger der HGE in ihrem Serum hatten.

	<i>E. equi</i> -Antikörper	<i>B. burgdorferi</i> -Antikörper
<b>Patienten mit Lyme-Borreliose n=58</b>	6 (10,3 %)	58 (100 %)
<b>Kontrollgruppe Blutspender n=51</b>	1 (2 %)	3 (6 %)

Tabelle 8

Laut dieser Untersuchung haben Patienten mit Lyme-Borreliose das 5,28fach erhöhte Risiko mit der HGE infiziert zu sein als gesunde Blutspender. Auch hier wurde mit dem *E. equi*-Antigen gearbeitet [15]. Die Seroprävalenzrate für die HGE bei Patienten mit Lyme-Borreliose in dem Teil Norwegens aus dem die Patienten stammen ist mit 10,3 % beachtlich hoch vor allem im Hinblick auf die Studie von Mitchell et al. als auch zu unserer. Allerdings testete die Arbeitsgruppe um Bakken nicht getrennt auf IgG- und IgM-Antikörper. Während der Prozentsatz der Blutspender mit Antikörpern gegen *E. equi* mit dem der in unser Studie auf Antikörper gegen HGE positiv getesteten nahezu übereinstimmt (in unserer Studie IgG-positive: 1,52 %), kommen Bakken et al. auf eine erhebliche höhere Ehrlichien-Seroprävalenzrate bei den Patienten mit gesicherter Borreliose (in unserer Studie IgG-positive: 4,18 %).

**Dumler et al.** testeten 185 Seren aus dem Jahr 1994 von Einwohnern der Koster-Inseln in Schweden auf Antikörper gegen *E. equi*, *E. chaffensis* und Borrelien. Sie kamen zu folgendem Ergebnis: 21 (11,4 %) hatten Antikörper gegen *E. equi* in ihrem Serum, 2 (1,1 %) gegen *E. chaffensis*, 25 (13,5 %) gegen Borrelien und 6 (3,2 %) sowohl gegen *E. equi* als auch gegen Borrelien.

185 Seren von Einwohnern der Koster-Inseln Schwedens (insgesamt 356)			
Antikörper gegen <i>E. equi</i>	Antikörper gegen <i>E. chaffensis</i>	Antikörper gegen Borrelien	Antikörper gegen Borrelien und <i>E. equi</i>
21 (11,4 %)	2 (1,1 %)	25 (13,5 %)	6 (3,2 %)

Tabelle 9

Diese Studie zeigt eine recht hohe Seroprävalenzrate für *E. equi* und Borrelien unter den ständigen Einwohnern der Koster-Inseln von denen 52 % an dieser Untersuchung teilnahmen (insgesamt 356 ständige Einwohner). Interessant ist diese Studie auch im Hinblick auf die von Fingerle et al. (s.u.): In dessen Untersuchung wiesen von den Waldarbeitern 80 von 150 (53,3 %) Antikörper gegen Borrelien und 21 (14 %) gegen den Erreger der HGE auf, während in der Untersuchung von Dumler et al. die Seroprävalenzraten für diese Erreger ähnlich hoch waren mit 13,5 % (Anti-Borrelien-Antikörper) bzw. 11,4 % (Anti-Ehrlichien-Antikörper) [20].

**Hunfeld et al.** untersuchte vier Kollektive aus dem Rhein-Main-Gebiet auf Antikörper gegen folgende Erreger: Borrelien, zeckenübertragene Enzephalitis Viren, *Babesia microti* und HGE. Die Kollektive bestanden aus Patienten mit symptomatischer Lyme-Borreliose (LB), Patienten mit seropositiver aber asymptomatischer Lyme-Borreliose, Patienten mit einer aktiven oder durchgemachten Syphilis und gesunden Blutspendern. Er kam zu folgenden Ergebnissen, wobei er das Kollektiv der Borreliosepatienten aufteilte in drei Gruppen, je nach Stadium der Borreliose.

Verschiedene Kollektive	Anti- <i>Borrelia-burgdorferi</i> -IgG- und /oder IgM-Positive	Anti-TBEV-IgG-positive	Anti- <i>Babesia-microti</i> -IgG- oder IgM-positive	Anti-HGE-IgG- und/oder IgM-positive	Reaktivität gegen mehr als einen TOBB
LB I (n=22)	14 (63,6 %)	1 (4,5 %)	4 (18,1 %)	3 (13,6 %)	2 (9,1 %)
LB II (n=38)	31 (81,5 %)	3 (2,6 %)	5 (13,1 %)	7 (18,4 %)	0
LB III (n=16)	16 (100 %)	3 (18,8 %)	0	0	0
Seropositive aber asympt. LB (n=44)	44 (100 %)	9 (20,5 %)	4 (9,1 %)	3 (6,8 %)	4 (9,1 %)
Pat. mit aktiver oder durchgem. Syphilis (n=50)	2 (4 %)	9 (18 %)	2 (4 %)	1 (2 %)	0
Blutspender	15 (15 %)	1 (1 %)	8 (8 %)	1 (1 %)	3 (3 %)

Tabelle 10

TOBB tick-borne pathogens other than *Borrelia burgdorferi* [19]

Interessant an der Studie von Hunfeld et al. ist vor allem, daß seine Arbeitsgruppe die Patienten mit Lyme-Borreliose bezüglich der verschiedenen Stadien der Erkrankung klassifizierte. Diese drei Gruppen wurden getrennt auf Antikörper gegen den Erreger der HGE getestet. Dabei stellte sich heraus, daß die Seroprävalenz der HGE im Stadium II der Borreliose am höchsten war mit 18,4 %, während bei den Patienten im Stadium III keiner (!) Antikörper gegen humane granulozytäre Ehrlichien aufwies. Die Seroprävalenzrate für humane granulozytäre Ehrlichien bei den Blutspendern wird von Hunfeld et al. mit 1 % ähnlich hoch wie in unserer Studie (Anti-HGE-IgG) beziffert. Die Arbeitsgruppe um Hunfeld arbeitete mit dem Immunfluoreszenztestkit derselben Firma (MRL Diagnostics) wie wir.

**Fingerle et al.** untersuchte die Seroprävalenz der HGE in Süddeutschland bei Risikogruppen. Seine Arbeitsgruppe testete mit einem Immunfluoreszenztest Patienten mit Lyme-Borreliose, Forstarbeiter und Blutspender. Ab einem Antikörpertiter von  $\geq 1:80$  für den Erreger der HGE wurde das betreffende Serum als positiv deklariert. Die Arbeitsgruppe kam zu folgenden Ergebnissen: 21 (14,0 %) von 150 Seren von Forstarbeitern wiesen Antikörper gegen den Erreger der HGE in ihrem Serum auf. 18 (12 %) davon nur IgG-Antikörper, 2 (1,3 %) nur IgM-Antikörper und 1 (0,7 %) sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper auf. Von den Forstarbeitern erinnerten sich 95 % an einen Zeckenbiß während der letzten fünf Jahre, 65 % von ihnen berichteten von mindestens zehn Bißen. Dabei wurden von sieben (33,3 %) der seropositiven und von 41 (31,8 %) der seronegativen Arbeiter klinische Symptome innerhalb der letzten fünf Jahre bemerkt.

Verschiedene Kollektive	Anti-HGE-Positiv	Nur IgG-Positiv	Nur IgM-Positiv	IgG- und IgM-Positiv
Patienten mit Lyme-Borreliose n=105	12 (11,4 %)	7 (6,7 %)	3 (2,9 %)	2 (1,9 %)
Forstarbeiter n=150	21 (14,0 %)	18 (12,0 %)	2 (1,3 %)	1 (0,7 %)
Blutspender n=103	2 (1,9 %)	2 (1,9 %)	0	0

Tabelle 11

Von den 150 Forstarbeitern hatten 80 (53,3 %) Antikörper gegen *B. burgdorferi* in ihrem Blut (ELISA). Dieses Ergebnis ist erstaunlich hoch.

Die Kollektive waren in dieser Arbeit erheblich kleiner als in unserer, wobei das Ergebnis für die Blutspender mit unserem fast übereinstimmt (in unserer Arbeit Anti-HGE-IgG-positive: 1,52 %).

Fingerle et al. arbeiteten in ihrer Studie mit HGE-infizierten HL60-Zellen als Antigen für den IFT [17].

**Nadelman et al.** berichten von einem Patienten der mit HGE und Borreliose koinfiziert worden war.

Der Patient war 47 Jahre alt, kam aus Westchester County, New York und präsentierte sich mit Fieber, Kopfschmerzen, Myalgie, Arthralgie und allgemeinem Schwächegefühl. Außerdem fielen sein „steifer Hals“, Husten und Konzentrationsschwäche auf. Vorher war er bei guter Gesundheit gewesen wobei die Symptome etwa einen Monat nach der Entfernung einer Zecke von seinem rechten Oberschenkel auftraten. Ein Erythem hatte der Patient damals jedoch nicht bemerkt. Bei der Untersuchung lag seine Temperatur bei 38,3 °C, sein Blutbild wies 3800 Leukozyten / $\mu$ l Blut, einen Hb 15,4 g/dl und 148 000 Thrombozyten / $\mu$ l auf. Laborwerte ergaben sich wie folgt: LDH 279 U/l, GOT 44 U/l, AP 120 U/l, Gamma-GT 49 U/l. Im Buffy Coat des Patienten konnte mittels PCR die DNA des Erregers der HGE nachgewiesen werden. Ebenso wies er hohe Antikörper-Titer gegen den Erreger der HGE auf. Im peripheren

Blutausstrich konnten Morulae in Granulozyten beobachtet werden. Die Borreliose wurde mittels PCR und serologisch bestätigt. Außerdem fiel ein etwa neun mal neun Zentimeter großes Erythem an seiner rechten Flanke auf, das ein Erythema migrans gewesen sein könnte wie die Autoren berichten.

Nachdem Proben zu Kulturzwecken entnommen worden waren, wurde der Patient mit 100 mg Doxycyclin zweimal am Tag zwei Wochen lang behandelt. Neun Tage nach seiner Vorstellung hatte sich sein Zustand deutlich gebessert, er klagte lediglich noch über Müdigkeit, während seine Laborwerte sich alle normalisiert hatten.

Der Patient hatte eine Erkrankung mit den klinischen und laborchemischen Zeichen von beiden Infektionen, der HGE und der Borreliose. Das vermutliche Erythema migrans war charakteristisch für das Frühstadium einer Borreliose wobei viele der systemischen Symptome und die abnormale Leberfunktion sowohl bei Borreliose als auch bei der HGE auftreten können. Der Husten war eher typisch für die Ehrlichiose und wird als Symptom von etwa einem Drittel der HGE-Patienten berichtet. Leukopenie und Thrombozytopenie sind pathognomonisch für die HGE, bei Borreliose jedoch nur selten.

Dieser Fall zeigt, daß HGE und Borreliose gleichzeitig bei Patienten auftreten können, wobei unklar ist, ob beide Infektionen von derselben Zecke oder von zwei Zecken übertragen wurden [16].

**Dumler** [9] verglich in einer Publikation HGE und Lyme-Borreliose. Sein Artikel bezieht sich auf Erkenntnisse die in den Vereinigten Staaten gemacht wurden. War es ursprünglich nur Spekulation, daß eine Koinfektion wegen erheblicher Gemeinsamkeiten der geographischer und saisonaler Verteilung möglich sei, wurde diese mittlerweile auch serologisch bestätigt. Laut seinen Daten haben etwa 10 % der Patienten mit gesicherter Borreliose eine serologisch nachgewiesene HGE-Infektion. Während eine HGE häufig mit Fieber, Kopfschmerzen, Schwitzen, Schüttelfrost beginnt, ist die Borreliose primär meistens schmerzlos und asymptomatisch. Außerdem beklagt sich fast die Hälfte der HGE- Patienten über Nausea, Erbrechen, Gewichtsverlust und Husten während diese Symptome bei der Borreliose sehr selten sind. Bei der

Diagnose der Borreliose sind Laborparameter keine große Hilfe, wenn die klinischen Befunde nicht sehr verdächtig sind. Bei der HGE jedoch zeigen über die Hälfte der Patienten Leukopenie, Thrombopenie, Anämie und erhöhte hepatische Transaminasen im Gegensatz zu 20 % der Borreliosepatienten.

Dumler fordert deshalb den breiten Einsatz von Doxycyclin wenn die Diagnose unklar bzw. eine Koinfektion nicht auszuschließen sei. In den Fällen bei denen die Borreliose nicht sicher zu diagnostizieren ist, weil es sich um „seronegative“, therapierefraktäre oder schwere chronische Formen handelt, vermutet der Autor, daß eventuell eine unabhängige persistierende HGE-Infektion oder -Koinfektion schuld sein könne.

Weiter berichtet der Autor von vier an Ehrlichiose verstorbenen Patienten bei denen keiner an der Ehrlichiose selbst sondern alle an erworbenen Immunabwehrdefekten starben. So war die Todesursache des ersten eine generalisierter Candidose, des zweiten eine schwere Herpesvirusinfektion und Kryptokokkenpneumonie, des dritten eine pulmonale Aspergillose und des vierten eine Myokarditis unklarer Genese gewesen.

Dumler weist noch auf die Fähigkeit der Ehrlichien zu persistierenden Infektionen hin. Er berichtet von einem verstorbenen Patienten bei dessen Autopsie mit Ehrlichien infiziertes Lebergewebe gefunden wurde obwohl er 68 Tage vorher infiziert und danach mit Doxycyclin und Chloramphenicol ausreichend therapiert worden war. In einem anderen Fall wurde der Erreger der HGE 30 Tage nach Beginn der Erkrankung im Blut eines bereits gesunden Patienten nachgewiesen.

In der vorhergehenden Publikation bezieht sich Dumler auf eine Publikation aus dem Jahr 1993, die er mit zwei Kollegen verfaßt hatte [22]. In einem weiteren Artikel berichtete er von der persistierenden Infektion eines 68 Jahre alten Mannes mit *E. chaffensis*. Dieser Patient wurde stationär aufgenommen, nachdem er eine Woche lang an Fieber, Nausea, Erbrechen und Diarrhöe gelitten hatte. Er kam aus einer ländlichen Gegend konnte sich jedoch nicht an einen Zeckenbiß erinnern.

Zur Vorgeschichte des Patienten gehörte eine milde Hypertonie und der Alkoholkonsum von sechs bis zehn Flaschen Bier pro Tag. Er präsentierte sich akut krank mit Fieber, Tachykardie (100/min) und orthostatischer Hypertonie. Seine Laborwerte ergaben folgendes: Leukozytenzahl 4800 / $\mu$ l, Hb 14,4 g/dl, Hämatokrit 42,5 %, Thrombozyten 36 000 / $\mu$ l, erhöhte Transaminasen (GOT 230 U/l und GPT 92 U/l), Bilirubin 1,3 mg/dl.

Trotz symptomatischer Therapie mit Ceftriaxon verschlechterte sich der Zustand des Patienten. Untersuchte Blutkulturen waren steril und es entwickelte sich eine Panzytopenie. Die Untersuchung von Knochenmark ergab eine Knochenmarkshypoplasie mit zahlreichen Histozyten. Daraufhin wurde die antimikrobielle Therapie mit Erythromycin und Chloramphenicol ergänzt und der Patient wurde wegen respiratorischer Insuffizienz mit Azidose und Hyperkapnie (PCO<sub>2</sub> 59 mmHg) auf die Intensivstation verlegt. Ab dem siebten Krankenhaustag wurde die Therapie mit Doxycyclin eingeleitet, worauf sich sein Zustand geringfügig verbesserte. Allerdings wurde in den folgenden Wochen die Ausweitung der Therapie mit Imipenem, Aciclovir, Ceftazidim, Tobramycin, Piperacillin, Amphotericin B und Vancomycin nötig, wegen verschiedener nosokomialer Infektionen, die sich entwickelten (*Pseudomonas cepacia*-Pneumonie, *Candida albicans* und *Aspergillus flavus* im Sputum). Im ersten Monat der Krankheit erfolgte ein vierfacher Anstieg der *E. canis*-Antikörper von 1:640 auf 1:2560. Trotz intensiver Therapie über zwei Monate blieb der Krankheitszustand des Patienten schlecht. Es kam zu gastrointestinalen Blutungen, Pankreatitis, Hyperbilirubinämie und der Patient blieb weiterhin beatmungspflichtig. Nach einem zweiten Herzstillstand wurde er nicht mehr wiederbelebt und verstarb 68 Tage nach dem Beginn seiner Symptomatik.

Bei der Autopsie ergaben sich u.a. eine pulmonale Aspergillose (s. vorherige Publikation), aktive Cytomegalieinfektion der Lungen, des Magens und des Pankreas, multiple nicht perforierende Magenulcera, hepatische Cholestase, akute und chronische Pankreatitis, ein fokaler intestinaler Infarkt und Splenomegalie. Im paraffineingebetteten Knochenmark vom fünften Krankenhaustag und im postmortalen Lebergewebe konnte *E. chaffensis* nachgewiesen werden. Außerdem wurden in demselben

Knochenmarksausstrich *Morulae* in mononukleären Zellen und Histozyten gefunden.

Daß obligat intrazelluläre Bakterien der Genera *Rickettsia*, *Coxiella* und *Ehrlichia* das Potential zur Persistenz haben, ist dokumentiert. Sowohl das chronische Q-Fieber und die chronische Kaninchenehrlichiose sind gegenüber einer antimikrobiellen Therapie refraktär. Der hier vorliegende Fall demonstrierte jedoch, dass *E. chaffensis* fähig ist zu einer persistierenden Infektion von menschlichem Gewebe.

Die initiale akute Erkrankung war gekennzeichnet von Leukopenie, Thrombozytopenie und erhöhten hepatischen Transaminasen. Sie trat bei einem Patienten zu einem Zeitpunkt und in einem Gebiet auf mit hoher Zeckenaktivität. Dieses Stadium wurde gefolgt von einer kurzen Ruhephase mit folgender dramatischer Verschlechterung zur terminalen Phase mit sekundären Infektionen. Dieser Verlauf entspricht dem der bekannten Kaninchenehrlichiose. Der komplizierte und prolongierte Verlauf der bei dem hier beschriebenen Patienten beobachtet wurde, konnte auch bei anderen dokumentierten Fällen beobachtet werden und könnte wegen Gewebsläsionen nach zu spät eingeleiteter Therapie, Sekundärinfektionen nach Breitspektrumantibiotikagabe oder persistierender Infektion mit *E. chaffensis* entstehen.

Die verschiedenen Arbeitsgruppen, wendeten z.T. unterschiedliches antigenes Material bei ihren Tests an. Über die serologische Kreuzreaktion von Antikörpern gegen *E. equi*, *E. phagocytophila* und dem Erreger der HGE publizierte **Dumler** et al. eine Studie [18].

Seine Arbeitsgruppe untersuchte Seren von Pferden, Hunden, Rindern, Menschen, Mäusen und Kaninchen die von verschiedenen Erregern aus der Species *Ehrlichia* infiziert worden waren auf Antikörper gegen *E. equi*, *E. phagocytophila*, *E. chaffensis*, *E. sennetsu*. Dabei wiesen alle Seren der Rekonvaleszenten HGE-Patienten Antikörper die mit dem *E. equi*-Antigen beim IFA reagierten auf. Eine Reaktion mit *E. chaffensis* erfolgte jedoch nicht.

Ebenso fanden sich in den Seren der mit *E. equi* oder *E. phagocytophila* infizierten oder immunisierten Tiere Antikörper gegen *E. equi*.

Das Ergebnis der Studie zeigte, daß der Erreger der HGE, *E. equi* und *E. phagocytophila* große Gemeinsamkeiten in ihrer Antigenität besitzen, wie sich bei IFA und Immunoblot erwies. Gekoppelt mit der nahezu identischen Nukleotidsequenz der 16S rRNA könnten diese Daten ein Hinweis darauf sein, daß diese drei Erreger sehr nah verwandt, wenn nicht sogar identisch sind.

**Pusterla** et al. publizierten eine Studie über die Seroprävalenz der HGE in der östlichen Schweiz. Sie untersuchten 1515 Seren von Einwohnern mit unterschiedlichem Risiko für Zeckenexposition. Sie unterteilten sie in fünf Gruppen:

Antikörpertiter für den Erreger der HGE			
Gruppe	Titer < 80	Titer = 80	Titer = 160
<b>Neugeborene</b> n=373	371 (99,5 %)	2 (0,5 %)	0
<b>Blutspender</b> n=530	524 (98,9 %)	6 (1,1 %)	0
<b>Jäger</b> n=258	235 (91,0 %)	19 (7,4 %)	4 (1,6 %)
<b>Patienten mit Lyme Borreliose</b> n=149	130 (87,3 %)	13 (8,7 %)	6 (4,0 %)
<b>Patienten mit CETE</b> n=205	165 (80,5 %)	35 (17,1 %)	5 (2,4 %)
<b>Gesamt</b> n=1515	1425 (94,0 %)	75 (5,0 %)	15 (1,0 %)

Tabelle 12

CETE central European tickborne encephalitis

Interessant ist das Ergebnis in der Gruppe der Neugeborenen, da bei ihnen eine Zeckenexposition sicher ausgeschlossen werden kann. 99,5 % dieser Seren hatten negative Antikörpertiter. Lediglich zwei Proben hatten einen Titer von 1:80, was auf mütterliche Antikörper zurückzuführen sein könnte. Im Vergleich dazu haben 0,85 % der Babys von Müttern die in der Schweiz leben Antikörper gegen *B. burgdorferi*. In der Gruppe der Blutspender die ein Kollektiv

mit geringem oder durchschnittlichem Risiko der Zeckenexposition repräsentieren soll hatten sechs Proben einen Titer von 1:80. In der Gruppe der Jäger mit verhältnismäßig hohem Risiko für Zeckenbisse fanden sich insgesamt 23 (8.9 %) mit einem Antikörpertiter von 1: 80 oder mehr. Eine hohe Prävalenzrate ergab sich in der Gruppe der Patienten mit Borreliose. Insgesamt 19 (12.8 %) der Patienten hatten einen erhöhten Antikörpertiter. Die höchsten Antikörpertiter konnten in der Gruppe der Patienten mit zentraleuropäischer zeckenübertragener Enzephalitis (CETE) nachgewiesen werden: 40 (19,5 %) hatten Antikörpertiter von 1:80 oder höher. Das auslösende Virus hat eine heterogene geographische Verteilung in der Schweiz und kommt vor allem in verstreuten eng begrenzten Gegenden vor.

Die Seren wurden mit einem Immunfluoreszenztest gescreent, der Ehrlichia phagocytophila als Antigen nutzte [24].

## 5.2. Wertigkeit der Methoden

Eine direkte Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien mit unserer ist wie oben bereits erwähnt, nicht in allen Fällen möglich. Es werden zum Teil unterschiedliche oder zusätzliche Testmethoden angewandt oder es werden verschieden Antigene bei dem Immunfluoreszenztest eingesetzt, so dass gewisse Schwankungen der Ergebniswerte schon dadurch bedingt sein können. So verwendeten wir einen kommerziellen Testkit für den Immunfluoreszenztest bei dem die Testfelder der Objektträger mit Ehrlichienaggregaten (*Morulae*) aus infizierten humanen Leukozyten (HL60-Zellen) beschichtet waren. In den Studien von Mitchell et al., Dumler et al. sowie von Bakken et al. wurde jedoch mit *E. equi*-Antigen für den Immunfluoreszenztest gearbeitet. Lediglich in der Studie von Fingerle et al. und von Hunfeld et al. wurde wie in unserer mit infizierten HL60-Zellen gearbeitet.

Generell gilt noch zu erwähnen, daß ein Antikörper-Immunfluoreszenztest immer das Potential für eine gewisse Unspezifität in sich birgt, die sich vor allem bei dem Test auf IgM-Antikörper niederschlägt. Zwar wurden IgG-Antikörper aus dem Patientenserum vorher abgetrennt (siehe Testanleitung

weiter oben), dennoch gibt es noch andere Faktoren, die zu dieser Problematik beitragen können. Es kann u.a. durch Rheumafaktoren oder durch Antikörper die der Organismus im Zusammenhang mit Lupus erythematoses, Multipler Sklerose, Epstein Barr-Virus-Infektion und mit Autoimmunerkrankungen bildet, das Testergebnis verfälscht werden. Diese Antikörper die durch polyklonale unspezifische Stimulation entstehen, binden an die im Test verwendeten Bakterienaggregate und können falsch positive Ergebnisse verursachen. Außerdem kann das Ergebnis durch Kreuzreaktionen, Heparin (Nachgerinnung im Test), floride Lues sowie durch eine bestehende Schwangerschaft beeinflusst werden. So könnte dieses Problem eventuell dazu beigetragen haben, daß die Seroprävalenzraten für IgM-Antikörper dieser Arbeit deshalb u.U. etwas höher ausgefallen sind als sie tatsächlich in den untersuchten Kollektiven vorhanden sind.

Jedoch besteht auch die Möglichkeit, daß die IgM-Seroprävalenzrate für den Erreger der HGE in den untersuchten Kollektiven tatsächlich so hoch ist wofür auch die Tatsache sprechen würde, dass von den 15 IgM-positiven Borrelienpatienten zehn auch IgM-Antikörper (zusätzlich zu den IgG-Antikörpern) gegen Borrelien aufwiesen. Es könnte sein, daß diese Patienten sowohl mit Borrelien als auch mit humanen granulozytären Ehrlichien vor nicht langer Zeit erst koinfiziert wurden und deshalb für beide Erreger noch IgM-Antikörpertiter bestehen.

## 6. Zusammenfassung und Beurteilung der eigenen Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wird deutlich, daß bei Patienten im Würzburger Raum, die sicher von einer oder mehreren Zecken gestochen worden sind, die Wahrscheinlichkeit, daß sie auch mit dem Erreger der HGE konfrontiert wurden, größer ist als bei gesunden Blutspendern, bei denen keine Häufung einer bestimmten Erkrankung zu erwarten ist. Die gleichzeitige Infektion mit Borrelien und dem Erreger der HGE ist eine mögliche Erklärung dafür, daß Patienten mit einer Borrelieninfektion eine höhere Seroprävalenzrate für Antikörper gegen Ehrlichien aufweisen als das Kollektiv der Blutspender. Allerdings könnte bei Patienten mit Borreliose der Prozentsatz derer die öfter von Zecken gestochen werden, weil sie zum Beispiel viel im Wald spazieren gehen, arbeiten etc. auch größer sein als im „Normalkollektiv“ der Blutspender, so daß auch die zweizeitige Infektion mit den verschiedenen Erregern eine Möglichkeit ist.

Die Tatsache, daß der Nachweis von Serumantikörpern gegen HGE auch im Würzburger Raum vorkommt, sollte den Blick der Ärzte für diese „neue“ durch Zecken übertragene Erkrankung schärfen. Verläufe die aufgrund der immunsuppressiven Wirkung der Erreger bis zum Tod von Patienten geführt haben, sind beschrieben worden – auch wenn dieser Ausgang der Erkrankung sicher nicht die Regel ist. Vielmehr zeichnet sich die Erkrankung durch ein unspezifisches schwer abzugrenzendes Krankheitsbild aus. Gerade für Dermatologen, Neurologen, Internisten und Allgemeinärzte sollte diese Erkrankung insofern bekannt sein, daß sie in die Verdachtsdiagnose mit einbezogen werden kann. Wenn ein Patient mit Borreliose mit intrazellulär wirksamen Medikamenten wie Doxycyclin behandelt wird, wird eine nicht diagnostizierte HGE-(Ko-)Infektion mitbehandelt, so daß sich kein Problem stellen wird. So fern das jedoch nicht der Fall ist könnte es wegen der Koinfektion zu sehr unerfreulichen protrahierten Verläufen kommen, die bei adäquater Medikation gut zu therapieren gewesen wären.

## 7. LITERATUR

- [1] Chen S., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H.: Identification of a Granulocytotropic Ehrlichia Species as the Etiologic Agent of Human Disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 589-595
- [2] Katavolos P., Armstrong P.M., Dawson J.E., Telford III S.R.: Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1998; 177:1422-5
- [3] Dumler S., Bakken J.S.: Ehrlichial Diseases of Humans: Emerging Tick-Borne Infections. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1102-10
- [4] Hardalo J., Quagliarello V., Dumler J.S.: Human Granulocytic Ehrlichiosis in Connecticut: Report of a Fatal Case. *Clin Infect Dis*. 1995;21:910-4
- [5] Walker D.H., Dumler J.S.: Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. *Emerg Inf Dis* 1996; 2: 1-3/96
- [6] Bakken J.S., Krueth J., Wilson-Nordskog C., Tilden R.L., Asanovich K., Dumler J.S.: Clinical and Laboratory Characteristics of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *JAMA* 1996; 275: 199-205
- [7] Goodman J.L., Nelson C., Vitale B., Madigan J.E., Dumler J.S., Kurtti T.J., Munderloh Ph.D. and U.: Direct Cultivation of the causative agent of human granulocytic Ehrlichiosis. *NEJM* 1996; 334: 209-15
- [8] Dumler J.S., Bakken J.S.: Human Granulocytic Ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: A Frequent Infection with the Potential for Persistence. *J Infect Dis* 1996; 173: 1027-30

- [9] Dumler J.S.: Is Human Granulocytic Ehrlichiosis a New Lyme Disease ? Review and Comparison of Clinical, Laboratory, Epidemiological, and Some Biological Features. Clin Infect Dis 1997; 25 (Suppl. 1): 43-7
- [10] Dumler J.S., Bakken J.S.: Human Granulocytic Ehrlichiosis in Wisconsin and Minnesota: A Frequent Infection with the Potential for Persistence. J Infect Dis 1996; 173: 1027-30
- [11] Horst H.: Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier. Erlangen 1991
- [12] Brandis H., Köhler W., Eggers H.J., Pulverer G.: Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie. 7.Auflage; Stuttgart 1994
- [13] Bakken J.S., Goellner P., Van Etten M., Boyle D.Z., Swonger O.L., Mattson S., Krueth J., Tilden R.L., Asanovich K., Walls J., Dumler J.S.: Seroprevalence of Human Granulocytic Ehrlichiosis Among Permanent Residents of Northwestern Wisconsin. Clin Infect Dis 1998; 27: 1491-6
- [14] Mitchell P.D., Reed K.D., Hofkes J.M.: Immunoserologic Evidence of Coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and Human Granulocytic Ehrlichia Species in Residents of Wisconsin and Minnesota. J Clin Microbiol 1996; 34: 724-7
- [15] Bakken J.S., Krueth J., Tilden R.L., Dumler J.S., Kristiansen B.E.: Serological Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis in Norway. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996; 15: 829-32
- [16] Nadelman R.B., Horowitz H.W., Hsieh T., Wu J.M., Agüero-Rosenfeld M.E., Schwartz I., Nowakowski J., Varde S., Wormser G.P.: Simultaneous Human Granulocytic Ehrlichiosis and Lyme Borreliosis. N Engl J Med 1997; 337: 27-30

- [17] Fingerle V., Goodman J.L., Johnson R.C., Kurtti T.J., Munderloh U.G., Wilske B.: Human Granulocytic Ehrlichiosis in Southern Germany: Increased Seroprevalence in High-Risk Groups. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3244-7
- [18] Dumler J.S., Asanovich K.M., Bakken J.S., Richter P., Kimsey R., Madigan J.E.: Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* and human granulocytic Ehrlichia. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1098-03
- [19] Hunfeld K.-P., Allwinn R., Peters S., Kraiczy P., Brade V.: Serologic evidence for tick-borne pathogens other than *Borrelia burgdorferi* (TOBB) in Lyme Borreliosis patients from midwestern Germany. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 110/24: 901-908
- [20] Dumler J.S., Dotevall L., Gustafson R., Granström M.: A Population-Based Seroepidemiologic Study of Human granulocytic Ehrlichiosis and Lyme Borreliosis on the West Coast of Sweden. *J Infect Dis* 1997; 175: 720-2
- [21] Anleitung zum HGE Immunfluoreszenztestkit der Firma MRL Diagnostics, USA
- [22] Dumler J.S., Sutker W.L., Walker D.H.: Persistent Infection with *Ehrlichia Chaffensis*. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 903-5
- [23] Webster P., Ijdo J.W., Chicoine L.M., Fikrig E.: The Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis Resides in an Endosomal Compartment. *J Clin Invest* 1998; 101: 1932-41
- [24] Pusterla N., Weber R., Wolfensberger C., Schär G., Schär G., Zbinden R., Fierz W., Madigan J.E., Dumler J.S., Lutz H.: Serological Evidence of

- Human Granulocytic Ehrlichiosis in Switzerland. *Eur J Clin Infect Dis* 1998; 17: 207-9
- [25] Spach D.H., Liles W.C., Campbell G.L., Quick R.E., Anderson D.E., Fritsche T.R.: Tick-Borne Diseases in the United States. *NEJM*; 329: 936-47
- [26] Anderson B.E., Dawson J.E., Jones D.C., Wilson K.H.: *Ehrlichia chaffensis*, a New Species Associated with Human Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2828-42
- [27] Fichtenbaum C.J., Peterson L.R., Weil G.J.: Ehrlichiosis Presenting as a Life – Threatening Illness with Features of the Toxic Shock Syndrome. *Am J Med* 1993; 95: 351-7
- [28] Dumler J.S.: Serodiagnosis of Human Ehrlichiosis. *Clin Immun* 1994; 14: 65-8
- [29] Bakken J.S., Dumler J.S., Chen S.-M., Eckman M.R., van Etta L.L., Walker D.H.: Human Granulocytic Ehrlichiosis in the Upper Midwest United States. *JAMA* 1994; 272: 212-8
- [30] Roland W.E., McDonald G., Caldwell C.W., Everett E.D.: Ehrlichiosis – A Cause of Prolonged Fever. *Clin Infect Dis* 1995;. 20: 821-5
- [31] Yevich S.J., Sánchez J.L., DeFraités R.F., Rives C.C., Dawson J.E., Uhaa I.J., Johnson B.J.B., Fishbein D.B.: Seroepidemiology of Infections Due to Spotted Fever Group Rickettsiae and Ehrlichia Species in Military Personnel Exposed in Areas of the United States where Such Infections Are Endemic. *J Infect Dis* 1995;. 171: 1266-73

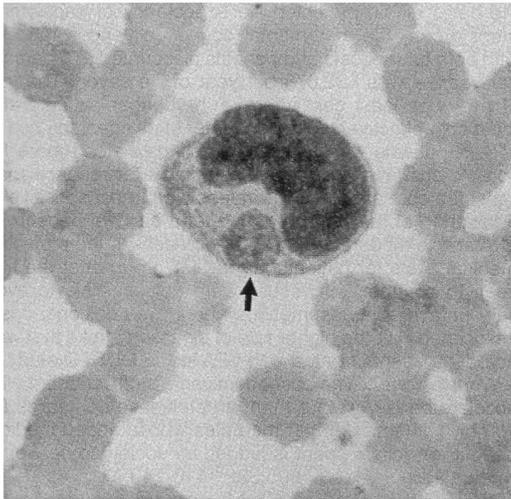
- [32] Fishbein D.B., Dennis D.T.: Tick-Borne Diseases – A Growing Risk. *NEJM* 1995; 17: 452-3
- [33] Heymann W.R.: Human Ehrlichiosis. *International J Derm* 1995;. 34: 618-9
- [34] Magnarelli L.A., Stafford III K.C., Mather T.N., Yeh M.T., Horn K.D., Dumler J.S.: Hemocytic Rickettsia-Like Organisms in Ticks: Serologic Reactivity with Antisera to Ehrlichiae and Detection of DNA of Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by PCR. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2710-4
- [35] Pancholi P., Kolbert C.P., Mitchell P.D., Reed K.D., Dumler J.S., Bakken J.S., Telford III S.R. Persing D.H.: Ixodes Dammini as a Potential Vector of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1995; 172: 1007-12
- [36] Wong S., Grady L.J.: Ehrlichia infection as a Cause of severe respiratory distress. *NEJM* 1996; 334: 273
- [37] Wormser G.P., Horowitz H.W., Dumler J.S., Schwartz I., Aguero-Rosenfeld M.: False-positive Lyme disease serology in human granulocytic ehrlichiosis. *Lancet* 1996; 347(9006): 981-2
- [38] Sunket A., Ramirez J.: A Case of Concurrent Lyme Meningitis with Ehrlichiosis. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 527-8
- [39] Günthard H.F., Péter O., Gubler J.: Leukopenia and Thrombocytopenia in a Patient with Early Lyme Borreliosis. *Clin Infect Dis* 1996;. 22: 1119-20
- [40] Bakken J.S., Krueth J.K., Lund T., Malkovitch D., Asanovich K., Dumler J.S.: Exposure to Deer Blood May Be a Cause of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 198

- [41] Ratnasamy N., Everett E.D., Roland W.E., McDonald G., Caldwell C.W.: Central Nervous System Manifestations of Human Ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 314-9
- [42] Agüero-Rosenfeld M.E., Horowitz H.W., Wormser G.P., McKenna D.F., Nowakowski J., Muñoz J., Dumler J.S.: Human Granulocytic Ehrlichiosis: A Case Series from a Medical Center in New York State. *Ann Intern Med* 1996; 125: 904-8
- [43] Fritz C.L., Kjemtrup A.M., Conrad P.A., Flores G.R., Campbell G.L., Schriefer M.E., Gallo D., Vugia D.J.: Seroepidemiology of Emerging Tickborne Infectious Diseases in a Northern California Community. *J Infect Dis* 1997; 175: 1432-9
- [44] Telford III S.R.: Risk for Acquiring Human Granulocytic Ehrlichiosis: Exposure to Deer Blood or Deer Ticks ?. Bakken J.S., Dumler J.S.. Reply. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 531-533
- [45] Nadelman R.B., Strle F., Horowitz H.W., Agger W.A., Wormser G.P.: Leukopenia, Thrombocytopenia, and Lyme Borreliosis: Is There an Association ?. Péter O., Gubler J., Günthard H.F.. Reply. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1027-9
- [46] Petrovec M., Furlan S.L., Zupanc T.A., Strle F., Brouqui P., Roux V., Dumler J.S.: Human Disease in Europe Caused by a Granulocytic Ehrlichia Species. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1556-9
- [47] Daniels T.J., Falco R.C., Schwartz I., Varde S., Robbins R.G.: Deer Ticks (*Ixodes Scapularis*) and the Agents of Lyme Disease and Human Granulocytic Ehrlichiosis in a New York City Park. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 353-5

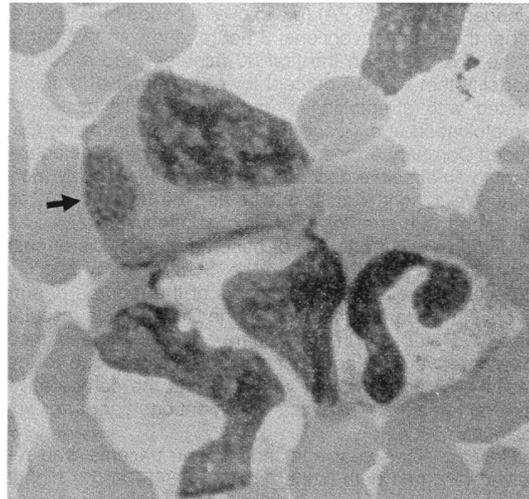
- [48] Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-4
- [49] Mullis K., Faloona F.. In: *Methods in enzymology*. Wu R. (Hrsg.). Academic Press 1987; New York and London. 155:335
- [50] Chien A., Edgar D.B., Trela J.M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976; 127: 1550-7
- [51] Kwok S., Higuchi R.: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1988; 339: 237-8
- [52] Fingerle V., Munderloh U.G., Liegl G., Wilske B.: Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* 1999; 188(3): 145-9
- [53] Yoshiie K., Kim H., Mott J., Rikihisa Y.: Intracellular Infection by the Human Granulocytic Ehrlichiosis Agent inhibits Human Neutrophil Apoptosis. *Infect Immun* 2000; 68(3): 1125-33
- [54] Aguero-Rosenfeld M.E., Kalentarpur F., Baluch M., Horowitz H.W., McKenna D.F., Raffalli J.T., Hsieh T., Wu J., Dumler J.S., Wormser G.P.: Serology of Culture-confirmed Cases of Human Granulocytic Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 635-8
- [55] Glaser C., Johnson E.: Images in Clinical Medicine. *NEJM* 1995; 21: 1417

## 8. ANHANG

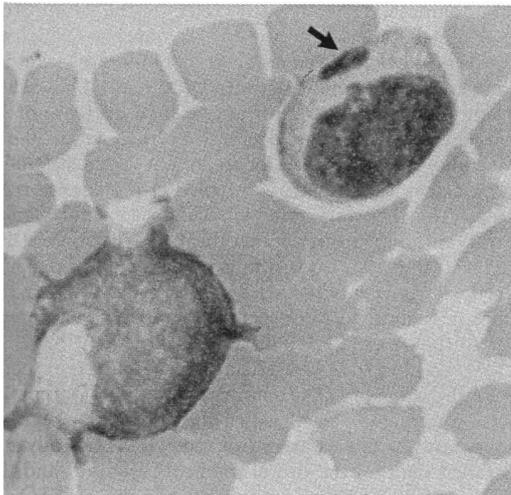
### 8.1. Abbildungen von intraleukozytären HGE-Aggregaten (Morulae)



A



B



C

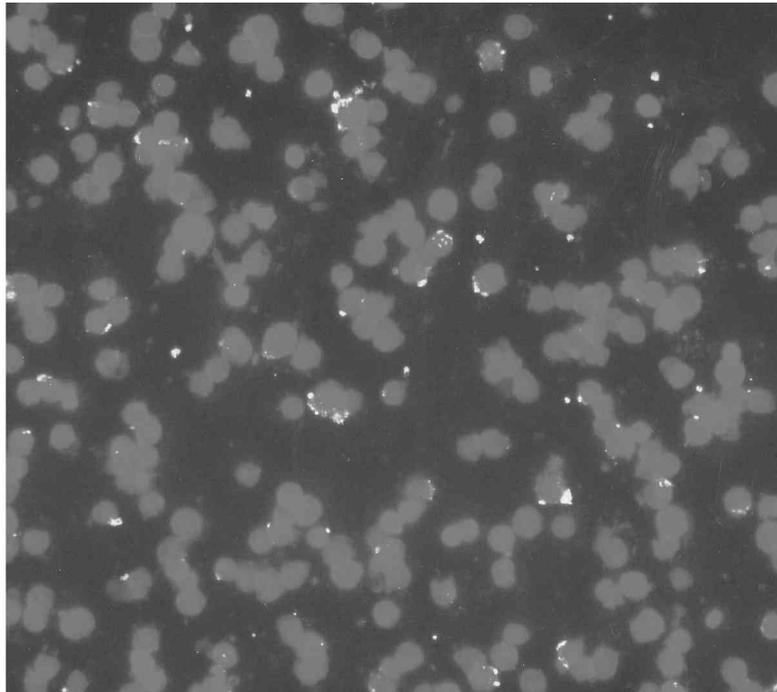
Intraleukozytäre Bakterienaggregate bestehend aus Ehrlichien im Buffy-Coat-Ausstrich eines 13jährigen Mädchens mit Fieber, Enzephalitis, Neutropenie und disseminierter intravasaler Gerinnung.

Die Abbildungen A und B zeigen Einschlusskörperchen als sogenannte Morulae, Abbildung C zeigt ein unreifes Einschlusskörperchen

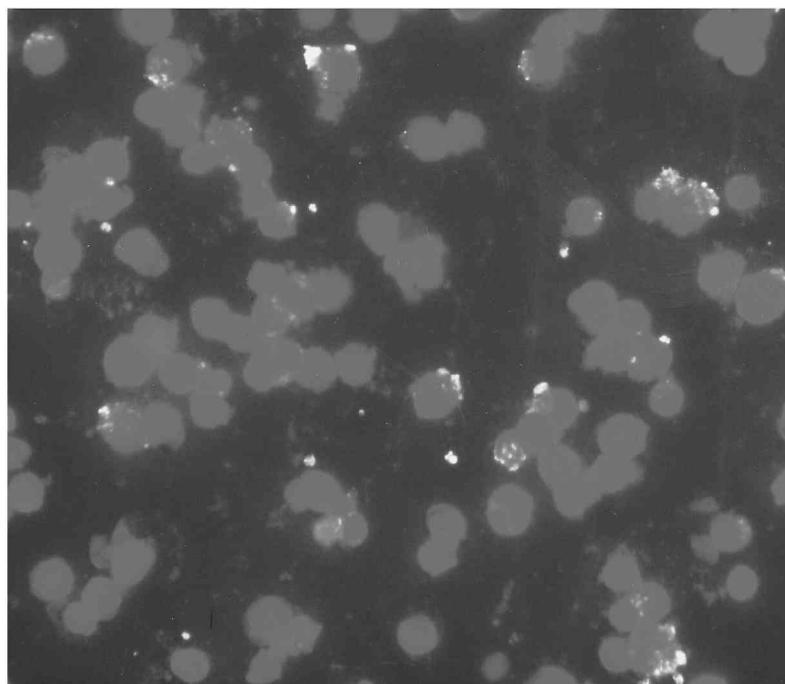
aus dem New England Journal of Medicine;  
Vol. 332 No. 21; p 1417

## 8.2. Fotografien von positiven und negativen Immunfluoreszenztests

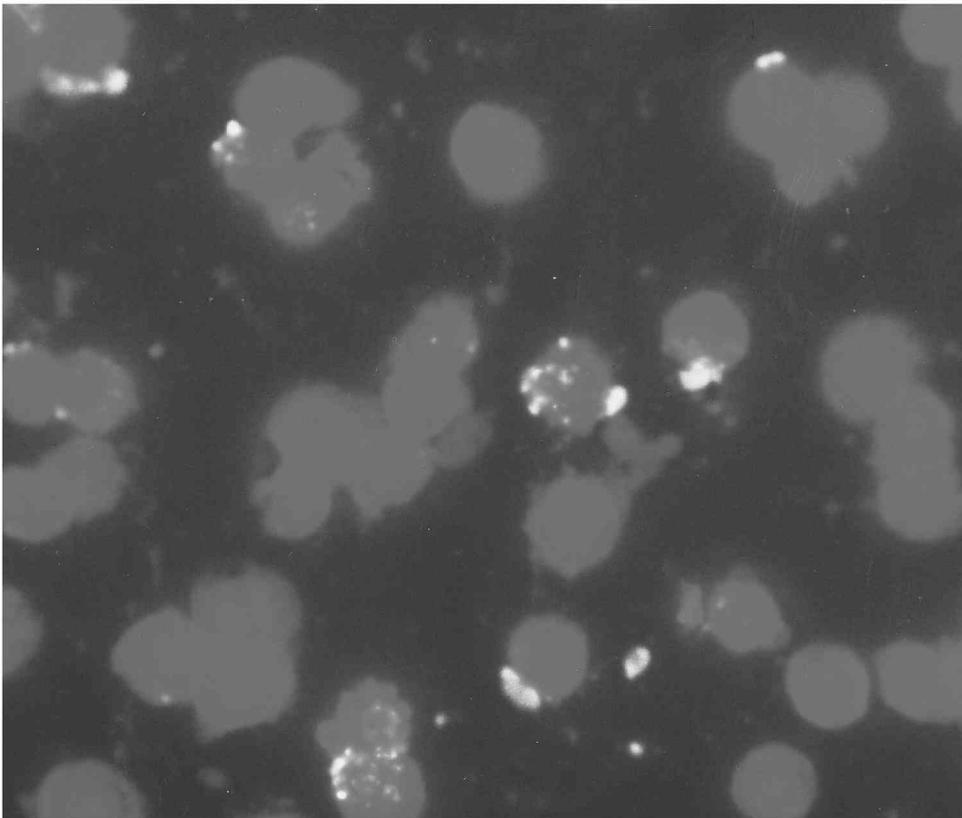
Positive Immunfluoreszenztests  
(in verschiedenen Vergrößerungen)



160fach



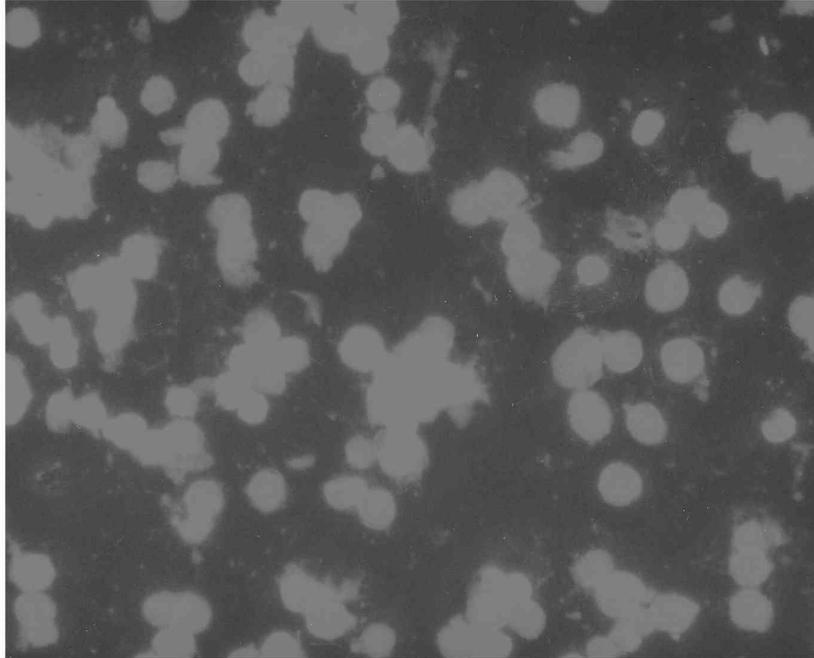
250fach



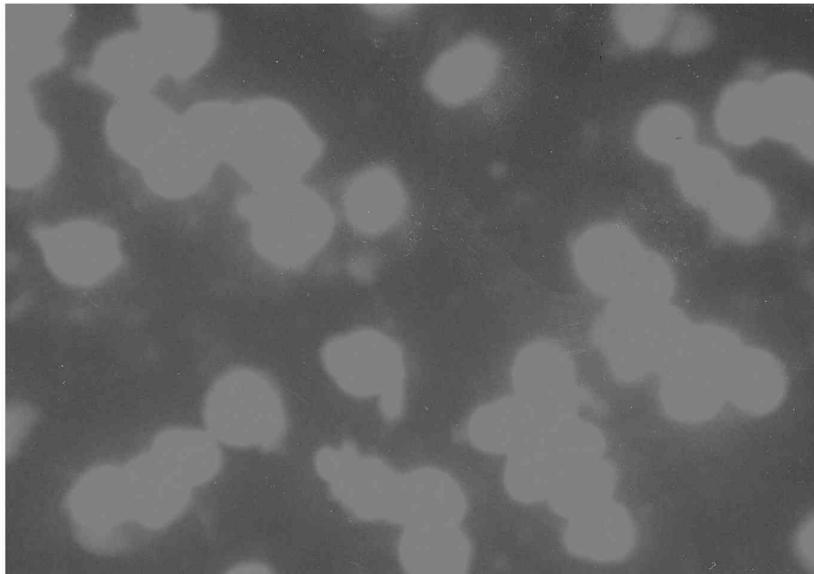
400fach

Fotos: Christian Stolz

**Negative Immunfluoreszenztests**  
(in verschiedenen Vergrößerungen)



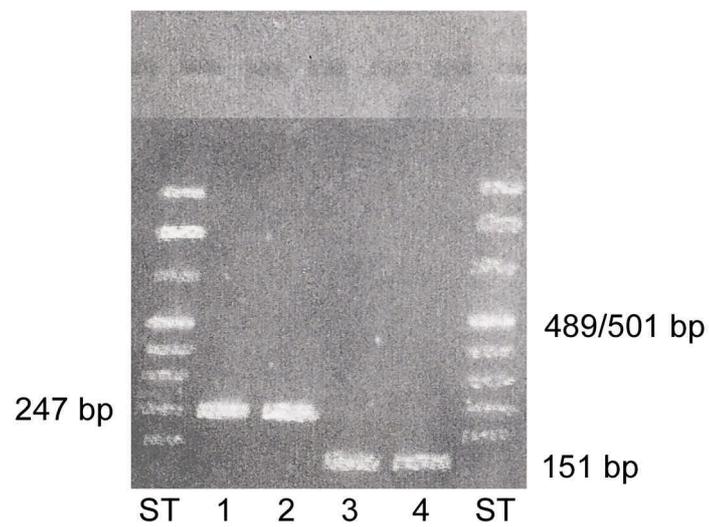
250fach



400fach

Fotos: Christian Stolz

### 8.3. Abbildung der Agarose-Gelelektrophorese amplifizierter DNA-Fragmente von Humanen Granulozytären Ehrlichien



ST = DNA-Längenstandard VIII

1 und 2 = PCR-Produkt mit Primern EHR 521/747

3 und 4 = PCR-Produkt mit Primern GER 3/4

Foto: Christian Stolz

## **DANKSAGUNG**

Abschließend soll mein besonderer Dank Herrn Dr. Mayer gelten für die Überlassung dieses interessanten Themas, die Förderung meiner Arbeit und die wertvollen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei der Transfusionsmedizinischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg für die gute Zusammenarbeit, bei den Mitarbeiterinnen des Labortrakts für die freundliche Einweisung und Anleitung in verschiedene Methoden der Labormedizin, bei dem Personal des Immunhistologischen Labors für die Hilfe beim Fotografieren immunfluoreszenzmikroskopischer Bilder und bei Herrn Krämer für die Bildentwicklung (Labors und Fotoentwicklung in der Dermatologischen Universitätsklinik).

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Stolz  
Vorname: Christian  
Geburtsdatum/-ort: 8.7.1974 in Würzburg  
Anschrift: Im Tale 35  
20251 Hamburg  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung:

9/81 – 7/85 Volksschule Würzburg Dürrbachgrund  
9/85 – 6/94 Matthias-Grünwald-Gymnasium Würzburg

### Zivildienst:

7/94 – 9/95 Missionsärztliche Klinik Würzburg  
(Helfer im Pflegedienst)

### Hochschulbildung:

10/95 – 9/97 Vorklinisches Studium an der Universität  
Würzburg  
9/97 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)  
10/97 – 3/01 Klinisches Studium an der Universität Würzburg  
8/98 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
(Note: befriedigend)  
3/01 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
(Note: gut)  
4/01 – 3/02 Praktisches Jahr  
  
Promotion Dr. Johannes Mayer  
Klinik und Poliklinik für  
Dermatologie und Venerologie der

Universität Würzburg  
Thema: Seroprävalenz der  
Humanen Granulozytären  
Ehrlichiose in verschiedenen Risikogruppen

**Praktische Erfahrung:**

3/98	Famulatur Innere Medizin Missionsärztliche Klinik Würzburg
9/98 – 10/98	Famulatur Gynäkologie Praxis Dr. med. Bartsch in Würzburg
10/99	Famulatur Plastische Chirurgie Universitätsklinik Würzburg
3/00 – 4/00	Famulatur Plastische Chirurgie Sunnybrook Health Science Center Klinik der Universität Toronto / Kanada
7/00 – 8/00	Famulatur Plastische Chirurgie Praxis Prof. Dr. med. Eckert Würzburg
4/01 – 8/01	1. Terial des Praktischen Jahres, Chirurgie, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
8/01 – 12/01	2. Terial des Praktischen Jahres, Neurochirurgie, Neurochirurgische Universitätsklinik Würzburg
12/01 – 3/02	3. Terial des Praktischen Jahres, Innere Medizin, Missionsärztliche Klinik Würzburg

**Berufliche Nebentätigkeiten:**

11/95 – 10/98	Sitzwachen als Helfer im Pflegebereich auf internistischen Stationen der Universitätsklinik Würzburg
---------------	--

**Beruflicher Werdegang:**

Seit 6/02

Anstellung als Arzt im Praktikum im  
Diakoniekrankenhaus  
Alten Eichen, Hamburg

**Sonstige Kenntnisse:**

Sprachen

10/97 – 7/00

Gute Sprachkenntnisse in Englisch  
Sprachkurse in Spanisch an der  
Universität Würzburg  
(Fortgeschrittene I und II,  
Oberstufe, Phonetik)

EDV

Word, Power Point, Excel

**Persönliche Interessen:**

Sport

Laufen, Radfahren, Badminton

Musik

Gitarre

Hamburg, den 25.01.03

