



Juno Kim, *1995

Schule:
Bündner Kantonsschule, Chur

Eingang der Arbeit:
April 2015

Zur Veröffentlichung angenommen:
Juli 2015

Neuer Schrecken im Reich der Zecken?

Nachweis von *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in Zecken des Bündner Rheintals

Candidatus Neoehrlichia mikurensis - Diesen Namen trägt ein Bakterium, das erstmals 2004 in Japan beschrieben wurde. Fünf Jahre später entdeckten Forscher in Zürich dessen Humanpathogenität. Als bedeutendster Überträger kommt nur die Zecke in Frage. Ziel dieser Arbeit war es, Informationen über das Vorkommen von *Ca. N. mikurensis* in Zecken des Kantons Graubünden (Ostschweiz) zu erhalten.

1 Einleitung

Gewisse Zeckenarten sind bekannt als Überträger von diversen Krankheitserregern. Diese Eignung kommt daher, weil sie um sich weiter zu entwickeln jeweils eine Blutmahlzeit von unterschiedlichen Wirten benötigen. Der Gemeine Holzbock (*Ixodes ricinus*), die häufigste Zeckenart in Europa ist dreiwirtig und entwickelt sich folglich auch in drei Stadien, nämlich von der Larve zur Nymphe und schließlich zum Adulttier. Dabei infiziert sich oft schon die Larve beim ersten Saugakt an einem Reservoirwirt mit Erregern. Kleinnager, wie Ratten, welche unbeeinträchtigt größere Mengen an Erregern in sich tragen können, werden als Reservoirwirte bezeichnet. Da die Verdauung der Zecke intrazellulär abläuft, herrscht in deren Darm ein verdauungsenzymfreies Milieu und somit ein ideales Umfeld für Erreger, wie dem Bakterium *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Erreger der Lyme-Borreliose) und

dem FSME-Virus (Auslöser der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)) [1].

Ca. N. mikurensis ist ein gram-negatives Bakterium der Familie *Anaplasmataceae*, welche sich in sechs Gattungen aufteilt, nämlich in *Aegyptianella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neoehrlichia*, *Neorickettsia* und *Wolbachia* [5]. Die Gattung *Neoehrlichia* wird bisher nur von den beiden Arten *Ca. N. lotoris* [16] und *Ca. N. mikurensis* [5] vertreten. Der Beiname '*Candidatus*' wird für jene Bakterien verwendet, die schwierig oder unmöglich zu kultivieren sind und deshalb nur mangelhaft beschrieben sind [9]. *Ca. N. mikurensis* wurde erstmals 2004 in wild gefangenen Wanderratten (*Rattus norvegicus*) und in Zecken (*Ixodes ovatus*) nachgewiesen. Diese Ratten wurden auf der japanischen Insel Mikura eingefangen - daher der Beiname '*mikurensis*'. Nach phylogenetischer Analyse bestimmter Gensequenzen des Bakteriums stellte

man fest, dass es zu keiner der damals fünf *Anaplasmataceae*-Gattungen passte, sondern eine eigene Gattung bildete. Sie wurde *Neoehrlichia* genannt, was so viel heißt wie 'Neue-Ehrlichia' [5]. 2009 wurde *Ca. N. mikurensis* im Blut eines Patienten des Universitätsspital in Zürich nachgewiesen. Der Patient litt seit zehn Tagen unter anhaltendem Unwohlsein mit Fieber bis 39,5 °C, mittleren Atembeschwerden und Frösteln. Dieser Fall bewies die Humanpathogenität des Bakteriums. Das neue Erkrankungsbild wird Neoehrlichiose genannt [2]. Inzwischen sind einzelne Fälle beim Menschen in Deutschland [14], Schweiz [8], Schweden [15], Tschechien [10] und in China [6] beschrieben worden. Als allgemeine Symptome gelten Rückfallfieber, Unwohlsein und Gewichtsverlust. Anhand einer sechs-wöchigen antibiotischen Behandlung mit Doxycycline lassen sich Patienten davon vollständig heilen [8]. Das Vorkommen wurde außerdem

in weiteren Ländern Europas, in Russland [12] und auch in Nigeria [4] bestätigt. Während Ratten dem Bakterium ein natürliches Reservoir bieten, dienen Zecken als Überträger [8]. In der Schweiz lagen bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit zwei Studien zu Befallsraten in Zecken vor. Laut diesen Studien beträgt die mittlere Befallsrate in der Westschweiz 6,4 % [7] und die minimale Befallsrate in Zecken im Großraum Zürich >4,6 % [8].

2 Fragestellung

Nachdem sich die Westschweiz und der Großraum Zürich als Risikogebiete für Neoehrlichiose entpuppt hatten, drängte sich bei mir die Frage auf, ob dieser Erreger auch in den Zecken meiner Wohn- und Freizeitumgebung lauert und falls ja, wie hoch deren Befallsrate ist.

3 Methodik

3.1 Feldarbeit

Zecken wurden anhand der Tick-Dragging-Methode im Frühjahr 2013 in drei verschiedenen Waldgebieten im Bündner Rheintal, Ostschweiz, gesammelt. Bei dieser Sammelmethode wird ein weißes Tuch über die Bodenvegetation gezogen, an welches sich die Zecken klammern, mit der Absicht einen Wirt für eine Blutmahlzeit zu befallen. Wiederkehrend sucht man das Tuch nach Zecken ab. Die gefundenen Zecken wurden dann zum Fixieren sofort in 70 %-iges Ethanol überführt. Die Sammelgebiete befinden sich alle zwischen 650 und 750 m ü. M. und sind die vom Menschen wohl meist frequentierten Naherholungsgebiete im Bündner Rheintal. Sie bestehen aus Wald und Weideflächen.

3.2 Laborarbeit

3.2.1 Erfassung der Proben

Im Labor wurden zunächst alle gesammelten Zecken unter einem Binokular nach deren Art, Entwicklungsstadium und Geschlecht kategorisiert. Die Nymphen (mittleres und gängigstes Entwicklungsstadium) wurden zu zehner Gruppen gepoolt (Poolen = mehrere Zecken zu einer Probe zusammenfassen), um den weiteren Arbeitsaufwand zu komprimieren.

3.2.2 DNA-Extraktion

Damit Mikroorganismen, solche wie Bakterien, eindeutig identifiziert werden können, muss über deren DNA verfahren werden. Um an diese zu gelangen, erfordert es die Isolation der gesamten DNA-Menge einer Probe. Dieser aufwändige und sub-

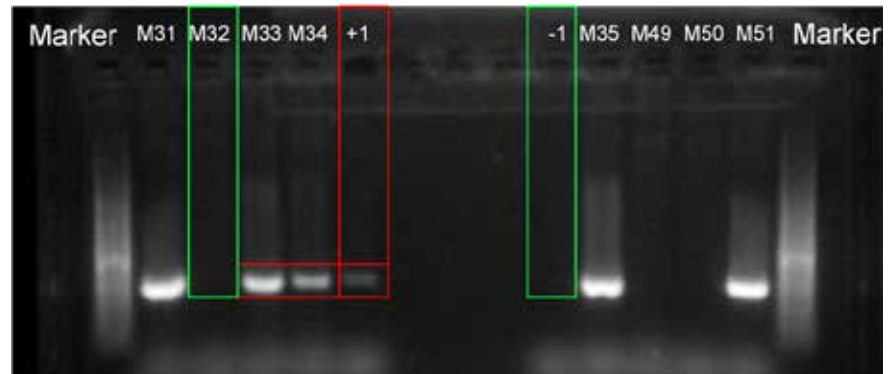


Abb. 1: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte verschiedener Proben. +1 ist die Positiv-Kontrolle. Demnach sind die Proben M31, M33-M35 und M51 auch positiv auf die getestete Bakterien-DNA, da sie auf gleicher Höhe wie bei +1 eine fluoreszierende Bande aus DNA aufweist. -1 stellt die Negativ-Kontrolle dar und dient als Referenz für die negativen Proben M32, M49 und M50, welche keine Banden ergaben.

tile Schritt wurde anhand des DNeasy® Blood & Tissue Kits von Qiagen® durchgeführt. Die Funktionsweise dieser Prozedur lässt sich vereinfacht in drei Schritten erklären. In einem ersten Schritt werden die Proben zerkleinert. Da mir im Schullabor keine optimalen Zerkleinerungsgeräte für Zecken zur Verfügung standen, improvisierte ich. Das stumpfe Ende einer Impfschlinge diente mir dabei als Pistill, da es genau in den tiefsten Punkt eines Eppendorf-Tubes passte und zerrieb auf diese Weise die Zecken. Als Nächstes werden die Proben enzymatisch verdaut und somit in Lösung gebracht. Danach wird die DNA, unter Hinzufügen von Ethanol, gefällt. Im letzten Schritt wird die Probe über eine Art Filter mehrmals zentrifugiert und durch Zugabe von verschiedenen Pufferlösungen von störenden Zellbestandteilen befreit. Am Schluss dieses Aufschlussverfahrens resultiert sodann die reine DNA des Trägers und des Erregers [11].

3.2.3 PCR

In einem ersten Arbeitsschritt wurden die Proben auf Zecken-DNA getestet, um die Funktionalität der Extraktion zu überprüfen. Dieser wurde mit Hilfe einer konventionellen PCR (Polymerase-Kettenreaktion) durchgeführt. Die PCR ist eine Methode zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Vereinfacht dargestellt läuft die PCR in drei Stufen ab. In der Ersten werden die DNA-Stränge durch Erhitzen voneinander getrennt. Zweitens werden die Proben auf eine spezifisch definierte Temperatur abgekühlt, um die gewünschte Sequenz anhand des Andockens von Oligonukleotiden (sog. Primer) einzugrenzen. In der letzten Stufe werden die Proben auf 72 °C erhitzt, was der optimalen Temperatur für die taq-Polymerase, ein Enzym,

das den komplementären DNA-Strang im eingegrenzten Bereich synthetisiert, entspricht. Dieser Zyklus wird an die vierzigmal wiederholt, was durch eine Verdoppelung der DNA pro Zyklus, im Optimalfall zu einem exponentiellen Wachstum der DNA-Menge führt. Um nun festzustellen, ob ich überhaupt DNA aus der Extraktion gewonnen hatte, testete ich die Proben auf eine DNA-Sequenz, von der man weiß, dass sie ein Bestandteil der in Zecken vorkommenden DNA ist. Dazu wählte ich die universellen Primer (LCO1490 und HCO2198), die das COI-Gen (*cytochrome c oxidase subunit I gene*) umschließen [3]. Da die Proben mit vervielfältigter DNA nach der PCR nach wie vor farblos sind und sich von Proben ohne DNA mit dem Auge nicht unterscheiden lassen, erfordert es bei der konventionellen PCR einer Visualisierung, nämlich der Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden Agarose-Gele gefertigt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff (GelRed™) versetzt wurden. Die DNA-Proben wurden dann sorgfältig in je eine Vertiefung im Gel pipettiert. Nachdem ein Gel mit Proben geladen und eine elektrische Spannung von 100 Volt angesetzt worden war, wanderte die DNA, welche eine negative Ladung aufwies, in Richtung positiver Pol durch das Gel. Dabei ist die zurückgelegte Strecke von der Länge der DNA-Fragmente abhängig. Da die vervielfältigte DNA-Sequenz im Falle des COI-Gens eine Länge von genau 701-Basenpaaren aufweist, ordnete sich die DNA an einer ganz bestimmten Stelle auf dem Gel an. Unter UV-Licht konnte die DNA nun visualisiert und abfotografiert werden (siehe Abb. 1). Nur die Proben, die an der erwarteten Stelle eine sichtbare DNA-Ansammlung hatten, konnten als gelungene DNA-Extrakte gewertet und

für den eigentlichen Nachweis weiterverwendet werden. Im zweiten Arbeitsschritt wurde die PCR an den zuvor positiven Proben wiederholt, nur diesmal mit den beiden Primern IS58-62f und IS58-594r, welche ein Fragment des 16S rRNA-Gen umschließen, das spezifisch für das Bakterium *Ca. N. mikurensis* definiert ist [13]. Die PCR-Produkte wurden abermals einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen und unter UV-Licht abfotografiert und ausgewertet.

4 Resultate

Aus der Sammelaktion ging ein Total von 1.558 Zecken, ausschließlich der Art *Ixodes ricinus*, hervor. Davon bestand der Großteil (>90 %) aus Nymphen und ein kleiner Teil aus Adulttieren (siehe Abb. 2). An 102 Proben (1.020 Nymphen) wurde die DNA-Extraktion ausgeführt. In 56 Proben konnte nach dem ersten PCR-Durchlauf Zecken-DNA nachgewiesen werden. Die DNA-Extraktion war damit bei 55 % der Proben erfolgreich. Im zweiten Durchlauf wurden 42 Proben positiv auf das Bakterium *Ca. N. mikurensis* getestet, was gesamthaft 75 % Nachweis darstellt. Dieser Prozentsatz widerspiegelt jedoch weder die exakte noch die tatsächliche Befallsrate der Zecken. Durch das Poolen der Zecken lässt sich nicht bestimmen, wie viele der 10 Zecken in einer positiven Probe tatsächlich den Erreger in sich trugen. In der Annahme, dass pro positiven Pool maximal eine Zecke mit dem Bakterium infiziert war, erhält man die Mindestprävalenz. Somit kann schlussgefolgert werden, dass mindestens 7,5% der untersuchten Zecken von *Ca. N. mikurensis* befallen sind. Die gesammelten Zecken wurden nach jeweiligen Sammelgebieten

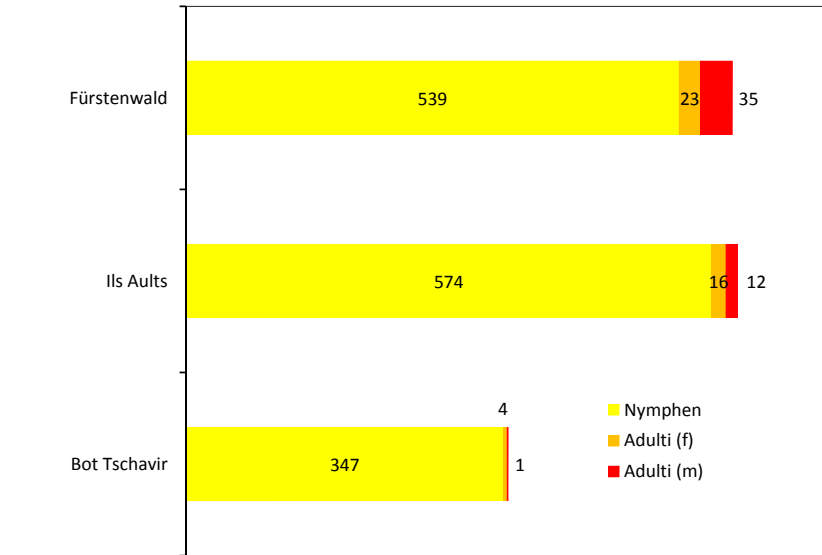


Abb. 2: Anzahl der in verschiedenen Sammelgebieten gesammelten Nymphen und Zecken.

getrennt voneinander untersucht, sodass für jedes Gebiet eine eindeutige Mindestbefallsrate hervorgeht (siehe Tab. 1).

Meine Resultate konnte ich am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich abschließend nachprüfen. Dort erhielt ich die Möglichkeit unter professioneller Anleitung real-time PCR an meinen Proben durchzuführen. Die Resultate aus der Nachprüfung bestätigten bis auf drei Proben meine Ergebnisse. Statistisch aussagekräftige Befallsraten konnten nur bei Nymphen bestimmt werden, da die Anzahl gesammelter Adulttiere zu gering war. Es sei jedoch vermerkt, dass auch in mehreren adulten Zecken *Ca. N. mikurensis* nachgewiesen wurde.

5 Diskussion

Für diese Arbeit wurden in drei verschiedenen Gebieten im Bündner Rheintal, zeitgleich und unter praktisch identischen

meteorologischen Bedingungen, Zecken gesammelt. Alle drei Sammelgebiete befinden sich in vergleichbarer Höhenlage. Bemerkenswert ist, dass im Bot Tschavir während des gleichen Zeitfensters deutlich weniger Zecken gesammelt werden konnten. Zum einen wurde in diesem Gebiet nur zu dritt (und nicht zu viert) gesammelt. Der entscheidendere Faktor jedoch war wohl das etwas kühlere Lokalklima in diesem Gebiet, welches darauf zurückzuführen ist, dass es im Unterschied zu den anderen Gebieten an einem Nordhang gelegen ist. Zudem fällt auf, dass mehr als 90 % der gesammelten Zecken Nymphen waren. Da Mitte April, kurz nach der Schneeschmelze, die Nymphen als Erstes aktiv werden und sich auf die Suche nach einem Wirten für die für ihre Weiterentwicklung benötigte Blutmahlzeit begeben, lässt sich diese Beobachtung mit dem Zeitpunkt der Sammelaktion in Zusammenhang bringen. Die

Gebiet	Stadium	Anzahl Pools	Zecken pro Pool	Zecken total	Pools positiv auf <i>Ca. Neoehrlichia mikurensis</i>		Mindestprozentsatz von positiven Zecken
Fürstenwald	Nymphen	21	10	210	17	81,00 %	8,10 %
	Adulti (f.)	3	5	15	1	33,30 %	6,70 %
	Adulti (m.)	5	5	25	2	40,00 %	8,00 %
Ils Aults	Nymphen	19	10	190	15	79,00 %	7,90 %
	Adulti (f.)	4	4	16	2	50,00 %	12,50 %
	Adulti (m.)	3	4	12	0	0,00 %	0,00 %
Bot Tschavir	Nymphen	16	10	160	10	62,50 %	6,30 %
Gesamt	Nymphen	56	10	560	42	75,00 %	7,50 %

Tab. 1: Resultate aufgeteilt nach Sammelgebieten. Die Befallsraten der Adulti können nicht als aussagekräftig gewertet werden, da die Anzahl der untersuchten Zecken zu gering ist.

Nymphen entwickeln sich während des Sommers zu Adulttieren, wonach wohl im Herbst vorwiegend Adulttiere vorzufinden wären. Die DNA-Extraktion war der Knackpunkt dieser Arbeit. Da Zecken mit einem sehr widerstandsfähigen Chitin-Panzer ausgerüstet sind und die Menge an organischem Material in Zecken verschwindend klein ist, war es mit den Mitteln, die mir zur Verfügung standen ein äußerst anspruchsvolles Unterfangen, deren DNA zu isolieren. Die Erfolgsquote von 55 % ließe sich auf jeden Fall verbessern, wenn zur Zerkleinerung modernste Gerätschaften und ein spezifisch programmierbarer Extraktionsroboter, wie sie heute bei großen Untersuchungen eingesetzt werden, zur Verfügung stünden. In allen drei untersuchten Gebieten konnte *Ca. N. mikurensis* nachgewiesen werden. Die Befallsrate bei Nymphen beträgt zusammengefasst >7,5 %. Wenn man dieses Resultat

mit den beiden anderen schweizerischen Studien vergleicht (Westschweiz (6,4 %) und Großraum Zürich (>4,6 %) [8,7]), ist festzustellen, dass das Resultat nicht besonders stark abweicht und den Erwartungen entspricht. Die Nachprüfung am Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich stützt meine Resultate. Daher und wegen der relativ hohen Befallsrate kann man das Bündner Rheintal durchaus als Risikogebiet für Neoehrlichiose einstufen. Da Neoehrlichiose sich, im Gegensatz zu anderen von Zecken übertragenen Krankheiten, nicht mit lebensgefährdenden Symptomen äußert und zudem nur bei immunsupprimierten Personen auftritt, darf das die Menschen nicht davon abschrecken, sich weiterhin in den Wäldern des Bündner Rheintals aufzuhalten. Dennoch sollte dem Vorkommen des Bakteriums besonders von der Ärzteschaft Beachtung geschenkt wer-

den, damit allfällig erkrankte Personen schnell die richtige Diagnose erhalten und somit effizient behandelt werden können.

Danksagung

Ein großer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Adrian Puntschart, welcher mir während der ganzen Arbeit tatkräftig und motivierend zur Seite stand. Auch bedanke ich mich bei Dr. Guido Bloemberg für seine Ratschläge und die Gelegenheit, einen ganzen Tag lang das Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Zürich für die Überprüfung meiner Resultate zu nutzen. Der Stiftung Simply Science danke ich für die Übernahme der angefallenen Kosten für Labormaterialien. Ebenfalls danke ich meinen Freunden von der Orientierungslauf Gruppe Chur (OLG Chur) für ihr großes Engagement beim Zeckensammeln.

Quellenverzeichnis

- [1] Dettner K, mutatio ultima: Dezember 2011. Thieme Römpf Online: Das Aktuelle Thema: Zecken. Zugangsdatum: 23. Mai 2013. <http://www.roempp.com/prod/>
- [2] Fehr JS, et al. 2010. Septicemia Caused by Tick-borne Bacterial Pathogen 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis'. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1.127-1.129.
- [3] Folmer O, et al. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- [4] Kamani J, et al. 2013. Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7.3: e2108.
- [5] Kawahara M, et al. 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 1.837-1.843.
- [6] Li H, et al. 2012. Human Infection with 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis', China. *Emerging Infectious Diseases* 18: 1.636-1.639.
- [7] Lommano E, et al. 2012. Infections and Coinfections of Questing *Ixodes ricinus* Ticks by Emerging Zoonotic Pathogens in Western Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4.606-4.612.
- [8] Maurer FP, et al. 2013. Close Geographic Association of Human Neoehrlichiosis and Tick Populations Carrying 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in Eastern Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 169-176.
- [9] Murray RGE, Stackebrandt E. 1995. Taxonomic Note: Implementation of the Provisional Status Candidatus for Incompletely Described Prokaryotes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 186-187.
- [10] Prucha M, et al. 2009. Rapid detection and identification of pathogens in critically ill and immunocompromised hosts using molecular techniques. *Critical Care* 13 (Suppl 1): 379. doi: 10.1186/cc7543.
- [11] Qiagen®. 2006. DNeasy® Blood & Tissue Handbook.
- [12] Rar VA, et al. 2010. Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in the Asian part of Russia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 1: 57-65.
- [13] Richter D, Matuschka FR. 2012. 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis', *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme Disease Spirochetes in Questing European Vector Ticks and in Feeding Ticks Removed from People. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 943-947.
- [14] von Loewenich FD, et al. 2010. Detection of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in two patients with severe febrile illnesses: evidence for a European sequence variant. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 2.630-2.635.
- [15] Welinder-Olsson C, et al. 2010. First case of human 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 1.956-1.959.
- [16] Yabsley MJ, et al. 2008. Characterization of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' (family Anaplasmataceae) from raccoons (*Procyon lotor*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2.794-2.798.