

Neue molekularbiologische Nachweismethoden am Beispiel zeckengebundener Infektionserreger

C.M. Leutenegger, N. Pusterla, R. Wicki, H. Lutz

Departement für Innere Veterinärmedizin der Universität Zürich

Zusammenfassung

Von Zecken übertragene zoonotische Infektionserreger sind in Europa seit Jahrzehnten bekannt. Zu den für die Veterinärmedizin wie auch für die Humanmedizin wichtigsten Vertretern gehören die Borreliose (oder auch Lyme Disease), die Ehrlichiose und die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME). Rechtzeitige Erkennung und frühe Behandlung ist nötig um Spätfolgen oder gar Todesfälle zu verhindern. Die klinische Diagnose der wichtigsten zeckengebundenen Erkrankungen, welche oftmals durch eine vielfältige Symptomatik erschwert wird, stützte sich neben den klinischen Befunden bislang auf die Anamnese der Zeckenexposition und auf den indirekten, gelegentlich auch auf den direkten Erregernachweis mit immunologischen Methoden. Der direkte, auf molekularbiologischen Methoden beruhende Erregernachweis hat die Diagnostik zahlreicher Infektionserkrankungen stark verbessert, da er bereits im Zeitraum zwischen Infektion und der Serikonversion zur Diagnose führen kann. Im vorliegenden Artikel wird kurz auf die wichtigsten zeckengebundenen Vertreter und ihre konventionelle Diagnostik eingegangen. Das Schwergewicht dieser Arbeit liegt auf einer Neuentwicklung in der molekularen Diagnostik – der Real-Time TaqMan® Polymerase Ketten Reaktion (PCR) – und ihrer Bedeutung im Zusammenhang mit der Diagnose von zeckengebundenen Infektionserregern.

Schlüsselwörter: Zeckengebundene Infektionserreger – Diagnose – Real-Time TaqMan® PCR

New molecular tools in the diagnosis of tick-borne diseases

Tick-borne zoonotic pathogens are well known in many areas all over the world. Among the tick-borne transmitted diseases in Switzerland, Lyme disease caused by *Borrelia burgdorferi*, ehrlichiosis caused by various species of *Ehrlichia* and tick-borne encephalitis caused by the tick-borne encephalitis virus (TBEV) are the most important zoonotic diseases. Early diagnosis and treatment is necessary to prevent fatal infections and chronic damage to various tissues. Due to the variety of uncharacteristic clinical signs, tick-borne diseases are not easily recognized. Diagnosis is based on clinical findings, a record of tick exposure, and direct or indirect detection of the pathogen. Here we discuss briefly the most important tick-borne infections and their diagnosis with emphasis on a new molecular diagnostic tool – the real-time TaqMan® PCR – and its importance for the diagnosis of tick-borne pathogens.

Key words: tick-borne diseases – diagnosis – Real-time TaqMan® PCR

Einleitung

Borreliose, Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) und die Ehrlichiose sind hauptsächlich von Zecken der Spezies *Ixodes* sp. übertragene Krankheitserreger. Zahlenmässig und auch aufgrund der Schwere der Erkrankung hat die Borreliose weit aus die grösste Bedeutung gefolgt von der FSME und der Ehrlichiose. Die Tularämie dürfte in der

Schweiz keine Rolle spielen, kann aber aufgrund der benachbarten Endemiegebiete vermutet werden. Das klinische Bild zeckenübertragener Infektionserkrankungen ist von einer Vielzahl von unspezifischen Symptomen geprägt, und die Diagnose muss durch Zeckenanamnese und Laborbefunde ergänzt werden. Im Folgenden soll ein

kurzer Überblick über die wichtigsten zeckengebundenen Infektionserreger, ihre Epidemiologie und die involvierten Vektoren sowie Aspekte der Diagnostik gegeben werden. Ein Schwergewicht soll auf die Real-Time TaqMan PCR, eine Neuentwicklung in der molekularen Diagnostik, gelegt werden.

Borreliose

Die weltweit verbreitete Lyme-Borreliose wird durch *Borrelia burgdorferi* sensu lato, zur Familie der Spirochäten gehörende Bakterien, hervorgerufen. Als natürliche Wirte, an denen sich Zecken durch Blutsaugen infizieren können, dienen verschiedene Säugetiere wie Rehe, Hirsche, Hasen, Mäuse und Hunde sowie auch Vögel. Das ubiquitäre Vorkommen der natürlichen Wirte führt zu einer nahezu flächendeckenden Verbreitung des Erregers. Vektoren sind in erster Linie Zecken der Spezies *Ixodes* sp., der Erreger konnte aber auch in fliegenden Insekten nachgewiesen werden (Halouzka et al., 1998; Zeman, 1998). Der Biss einer Zecke führt beim Menschen und sehr wahrscheinlich auch beim Haustier nur in einem kleinen Prozentsatz zur klinisch manifesten Infektion (Fahrer et al., 1998). In einzelnen Fällen kann es zu Spätschäden an Gelenken und am kardiovaskulären System kommen (Fahrer et al., 1998). Als Komplikation kann bei Pferd und Wiederkäuern Laminitis auftreten. Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptome und von Laborbefunden gestellt: Erstmanifestation der Infektion ist ein *Erythema chronicum migrans*, das bei Tieren meist wegen der Behaarung nicht beobachtet werden kann. Arthritis, Karditis sowie Meningopolyneuritis und seltener Glomerulopathie folgen als Zweitmanifestationen. Seltene Begleiterscheinungen der Borreliose beim Menschen wie Choroiditis, Hepatitis und Myositis scheinen in der Veterinärmedizin keine Bedeutung zu spielen. Die Diagnose basiert neben den klinischen Veränderungen und der Zeckenanamnese auf Laborbefunden. Dabei kommt dem Anstieg spezifischer Antikörper gepaarter Serumproben, die mittels Immunfluoreszenz- oder ELISA-Verfahren bestimmt werden, eine grosse Bedeutung zu. Die Einführung der PCR und die zunehmende Standardisierung und Automatisierung dieses Verfahrens hat zu einer dramatischen Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten geführt (Schmidt, 1997). Die Prävalenz von Borrelien in Zecken, nachgewiesen durch PCR oder durch Kultur der Bakterien, beträgt in der Schweiz mindestens 20% (Aeschlimann et al., 1987; Wicki et al., 2000). Mehrfachinfektion von Zecken mit verschiedenen pathogenen Erregern wurde be-

schrieben (Leutenegger et al., 1999a; Magnarelli et al., 1995; Mitchell et al., 1996) und kann die Diagnosestellung und damit die therapeutischen Massnahmen massiv erschweren (Weber et al., 1998).

Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME)

Die FSME ist in Zentraleuropa unter den zahlreichen, durch Viren verursachten Meningoenzephalitiden die einzige, die von Arthropoden übertragen wird. Der Erreger gehört zu den Flaviviren, welche eine hohe Affinität zum Hirnstamm und motorischen Vorderhornganglienzellen aufweisen, wodurch sich ihre klinische Hauptmanifestation erklärt. Der Lebenszyklus verläuft zwischen Zecken und deren natürlichen Wirten, vor allem Nage-, Wild- und Weidetieren, sowie Vögeln. Die Zecken dienen nicht nur als Vektoren, sondern auch als Reservoir, denn das FSME-Virus vermehrt sich in infizierten Zecken und besiedelt ihre Organe, was zur effizienten transovariellen Übertragung auf die Nachkommenschaft führt (Liebisch, 1978). Trotz dieser Eigenschaft kann sich das Virus nur in sogenannten Naturherden etablieren, welche geographisch stark lokalisiert und einem ausgeprägten Nord-Süd-Gefälle unterworfen sind. Die Infektionshäufigkeit des Menschen beträgt zwischen 184 pro 100 000 Einwohner in Skandinavien (Gustafson, 1994) und 0.9 auf 100 000 Einwohner in der Schweiz (Muller, 1998), kann aber in Endemiegebieten auf 5.4 auf 100 000 Einwohner ansteigen (Baumberger et al., 1996). In der Schweiz sind mehrere Endemiegebiete bekannt, darunter der Kanton Schaffhausen, der nördliche Kanton Zürich, der Nordwesten des Kanton Thurgau und das Gebiet um Thun, Kanton Bern. Weitere lokale Vorkommen von FSME-Viren wurden im Raum Elgg (Baumberger et al., 1996) und Kloten-Bülach (Wicki et al., 2000) nachgewiesen. Klinisch ähnelt die FSME beim Menschen der Poliomyelitis, welche durch einen zweigipfeligen Verlauf charakterisiert sind. Nur 10% der Infizierten gelangen in die zweite, symptomatische Phase, welche in 1–2 % der Fälle letal ausgehen. Die akute Phase dauert mehrere Tage und ist durch unspezifische Symptome charakterisiert. Der akuten Phase folgt ein 1–2 wöchiges beschwerdefreies Intervall, welches schliesslich durch die eigentlichen zentralnervösen Symptome abgelöst wird (Haglund et al., 1996). Die FSME wurde sowohl bei Klein- wie auch bei Grosstieren in Europa nachgewiesen (Truyen et al., 1990; Tipold et al., 1993; Gresikova et al., 1975; Vereta et al., 1991). Beim Hund verursacht das FSME Virus Myoclonus, Konvulsionen, Hemi- oder Tetraparese, Stupor, Aniskorie und Enzepha-

litis, welche oftmals letal endet oder zur Euthanasie führt (Wandeler et al, 1972). Immunhistochemischer Virusnachweis lokalisiert das Virus in den Purkinje Zellen und in den Neuronen des Hirnstammes (Weissenböck und Holzmann, 1997). Da die Infektion mit dem FSME-Virus zu keinen pathognomonischen Symptomen führt, sind Laboruntersuchungen unabdingbar. Veränderungen im Liquor mit erhöhter Zellzahl bis auf 1000 Zellen/ml und erhöhter Eiweissgehalt können als Hinweise, ein Titeranstieg der frühzeitig auftretenden IgM-Antikörper gegen FSME Antigen im ELISA oder im Immunfluoreszenztest als Beweis für eine zurückliegende Infektion betrachtet werden. Die PCR muss in der frühen, antikörper-freien Phase als wichtige Möglichkeit zur Frühdiagnostik betrachtet werden (Ramelow et al., 1993).

Ehrlichiose

Ehrlichiosen sind Rickettsieninfektionen, die bei Mensch und Tier vorkommen und durch Mikroorganismen der Gattung *Ehrlichia* verursacht werden. Diese obligat intrazellulären Erreger werden meist durch den Wirt die Zecken übertragen und befallen, je nach Art, entweder die Granulozyten oder die Monozyten des Wirtes. Die Infektion und die Vermehrung der übertragenen Ehrlichien in den Blutzellen des Wirtes führen zum Ausbruch einer fieberhaften Allgemeinerkrankung, die als Ehrlichiose bezeichnet wird. Die Wirtsspezifität, die geographische Verbreitung, das klinische Bild und die Affinität des Erregers zu Monozyten oder Granulozyten stellen wichtige Kriterien zur Differenzierung der Ehrlichienpezies dar. In Europa werden die häufigsten Ehrlichieninfektionen durch Vertreter der *E. phagocytophila*- und *E. canis*-Genogruppe verursacht. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten beim Menschen und bei Tieren vorkommenden Ehrlichien sowie deren

Zelltropismus und Erkrankungsspektrum. Die Klinik, Epidemiologie und Therapie der in der Schweiz bei Haus- und Weidetieren vorkommenden Ehrlichiosen wurde kürzlich in einer Arbeit beschrieben (Pusterla et al., 2000a).

Die Diagnose der Ehrlichiose durch den mikroskopischen Nachweis von Einschlusskörperchen während der akuten Krankheitsphase gelingt häufig bei *Ehrlichia phagocytophila*, dem Erreger des Weidefiebers des Rindes, der equinen und der caninen granulozytären Ehrlichiose, jedoch selten bei *E. canis*. Um die Diagnostik zu verbessern, wurden serologische Methoden wie die indirekte Immunfluoreszenz zum spezifischen Nachweis entwickelt (Ristic et al., 1972). Indirekte Immunfluoreszenztests wurden ebenfalls für die Diagnose der granulozytären Ehrlichiosen etabliert (Dumler et al., 1995). Der Nachweis eines Titeranstiegs erlaubt, die Diagnose einer Ehrlichiose retrospektiv zu stellen. Die PCR ermöglicht den Nachweis der Ehrlichien-DNA mit hoher diagnostischer Spezifität und Sensitivität (Biswas et al., 1990; Anderson et al., 1992; Iqbal et al., 1994; Barlough et al., 1996). Durch die Einführung der Real-Time TaqMan PCR in der veterinär- und humanmedizinischen Diagnostik wurde der Erregernachweis stark vereinfacht. Vor allem bei einer für die Lichtmikroskopie zu geringen Erregerzahl ermöglicht die hervorragende analytische Sensitivität dieses Verfahrens die Diagnosestellung (Pusterla et al., 1999). Am Veterinärmedizinischen Labor der Universität Zürich stehen sowohl die mikroskopische Diagnostik wie auch die indirekte Immunfluoreszenz und die TaqMan PCR für die Routinediagnostik der granulozytären und monozytären Ehrlichiosen bei Haus- und Weidetieren zur Verfügung.

Tularämie

Francisella tularensis ist das verursachende Agens der Tularämie, einer hochkontagiösen Infektionser-

Tabelle 1: Die wichtigsten monozytären und granulozytären Ehrlichiosen bei Haus- und Weidetieren: Klinik, Zelltropismus und Vektoren.

Spezies	Wirt	Erkrankung	Zelltropismus	Vektor
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Mensch	Humane monozytäre Ehrlichiose	Monozyten	<i>Amblyomma americanum</i>
<i>Ehrlichia canis</i>	Hund	Canine monozytäre Ehrlichiose	Monozyten	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>Ehrlichia equi</i>	Pferd	Equine granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>I. pacificus, I. scapularis</i>
<i>Ehrlichia equi</i>	Hund	Canine granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>I. pacificus, I. scapularis</i>
HGE-ähnlicher Erreger ¹	Hund	Canine granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>I. ricinus</i>
HGE-ähnlicher Erreger ¹	Katze	Feline granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>I. ricinus</i>
HGE-ähnlicher Erreger ¹	Mensch	Humane granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>Ixodes sp.</i>
HGE-ähnlicher Erreger ¹	Pferd	Equine granulozytäre Ehrlichiose	Granulozyten	<i>I. ricinus, I. scapularis</i>
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	Wiederkäuer	Weidefieber	Granulozyten	<i>I. ricinus, I. scapularis</i>

¹Erreger mit 100%iger Homologie des 16S rRNA-Gens zum Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose (Anderson et al., 1992); *Ixodes*

krankung mit signifikanter Morbidität und Letalität (Evans et al., 1985; Penn und Kinasewitz, 1987). Im Jahr 1911 wurden Francisella-Ausbrüche in Erdhörnchen im Anschluss an das Erdbeben in San Francisco beschrieben (McCoy, 1911) und der Erreger 1912 erfolgreich kultiviert (McCoy, 1912). Das verursachende Agens, das zunächst noch unbekannt war, konnte durch Stechfliegen experimentell übertragen werden, was der Erkrankung den Namen Hirsch-Fliegen Fieber eintrug (Pearse, 1911). Dr. Edwar Francis schliesslich konnte den Zusammenhang zwischen den Erkrankungen des Menschen, der Erdhörnchen und der Kaninchen und dem damals *Bacterium tulareense* benannten Erreger herstellen und bewies, dass die Hirsch-Fliege, aber auch Zecken, die natürlichen Vektoren darstellen (Francis und Mayne, 1921; Francis, 1921). Zu Ehren Dr. Francis wurde das Agens in *Francisella tularensis* unbenannt. Die frühesten Fallbeschreibungen in Japan gehen ins Jahr 1837 zurück (Hopla, 1974).

Tularämie ist in den USA, Europa und Russland weit verbreitet, beschränkt sich aber auf die nördliche Hemisphere. Die Inzidenz in den USA beträgt heute 0.15 Fälle pro 100 000 Einwohner. Die saisonalen Schwankungen im Auftreten der Tularämie gehen auf das Vorhandensein des Vektors im Sommer und auf jagdbedingte Expositionen im späten Winter zurück. Nagetiere spielen eine bedeutende Rolle als Reservoir. Menschen werden durch den Kontakt mit Vektoren oder mit kontaminierten tierischen Produkten, wie auch durch Aerosole infiziert. Der Erreger ist hochinfektiös mit einer minimalen Infektionsdosis von nur 10 Erregern; ein Umstand, welcher die Arbeit mit dem Erreger stark einschränkt. Zecken und Fliegen sind die Hauptvektoren in den USA, Mosquitos hingegen wurden als Vektoren in Skandinavien beschrieben (Christensen, 1984). Ausbrüche in Jagdgesellschaften gehen auf den Kontakt mit infizierten Tieren zurück (Young, 1968). Solche Ausbrüche können im ganzen Osteuropäischen Raum inklusive Österreich beobachtet werden, aus Spanien ist ein einzelner Ausbruch bekannt geworden (Hubalek et al., 1990; Hubalek et al., 1997; Labayru et al., 1999). Obwohl *F. tularensis* in der Schweiz aufgrund der benachbarten Endemiegebiete vermutet werden kann, gibt es keine Fallbeschreibungen aus der Humanmedizin. Der Erreger wurde aber wiederholt aus Ziegen (Bouvier et al., 1951; Burgisser, 1974) und aus einem Marmoset Affen isoliert (Posthaus et al., 1998). In einer Prävalenzstudie, in welcher mehr als 6000 Zecken auf *F. tularensis* untersucht wurden, konnte der Erreger auch in *Ixodes ricinus*-Zecken in der Schweiz mit einer Prävalenz von 0.13% nachgewiesen werden (Wicki et al., 2000). Ob es sich

bei der Tularämie um eine inexistente oder aber nicht-diagnostizierte Erkrankung in der Schweiz handelt, muss in epidemiologischen Studien abgeklärt werden.

Die akute Krankheitsphase kann beim Menschen in 25–50% der Infizierten beobachtet werden und ist von einem grippeähnlichen Syndrom geprägt. Nach dem initialen Stadium kommt es zu mehreren klinischen Bildern. Das häufigste Bild ist die ulceroglanduläre Tularämie mit nekrotisierenden Granulomen an der Eintrittsstelle des Erregers (Sanders und Hahn, 1968). Glanduläre Tularämie kann beobachtet werden, wenn keine offensichtliche Eintrittsstelle gefunden werden kann. Als besondere Form muss die oculoglanduläre Tularämie angesehen werden, welche durch Verschleppen des Erregers in die Konjunktiven durch mit Francisellen kontaminierte Spritzer oder Aerosole oder durch Fingerkontakt verursacht wird. Das klinische Bild reicht von inapparenter Infektion bis zur akuten Sepsis und raschem Tod (Scofield et al., 1992). Die klinische Verdachtsdiagnose muss durch Labortests bestätigt werden. Mikroagglutination und ELISA Verfahren kommen dabei zur Anwendung und ein 4-facher Anstieg der spezifischen Antikörper in einem Serumprobenpaar ist dabei ausschlaggebend für die Diagnose (Bevanger et al., 1988). Mehrere Methoden für die PCR Diagnostik wurden beschrieben (Long et al., 1993; Sjostedt et al., 1997).

Molekulare Diagnostik von zecken-gebundenen Infektionserregern

Die Entwicklung der Polymerase Ketten Reaktion (Mullis et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987) hat viele Aspekte der molekularen Biologie und der Diagnostik infektiöser Erkrankungen dramatisch verändert. Die Technik der PCR ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten Abschnittes der Erbsubstanz in einem Ausmass, dass diese optisch sichtbar gemacht werden. Der Nachweis beruht dabei auf der Eigenschaft der doppelsträngigen DNA, bestimmte Farbstoffe einzulagern, welche unter UV-Illumination die DNA sichtbar werden lässt. Obschon die konventionelle PCR ein gewaltiger Fortschritt war, wurde das Nachweisverfahren, welches bei der konventionellen PCR auf dem elektrophoretischen Auftrennen der PCR Produkte in einem porösen Agarosegel beruhte, massgebend weiterentwickelt. Eine der neuesten Entwicklungen in diesem Bereich wird als Echtzeit PCR bezeichnet (Real-Time PCR), bei welcher die PCR Produkte mit Hilfe einer Sonde (TaqMan Sonde), welche zwischen den beiden PCR Primern an die zu vermehrende Sequenz bindet, sichtbar gemacht werden (Abb. 1). Durch die

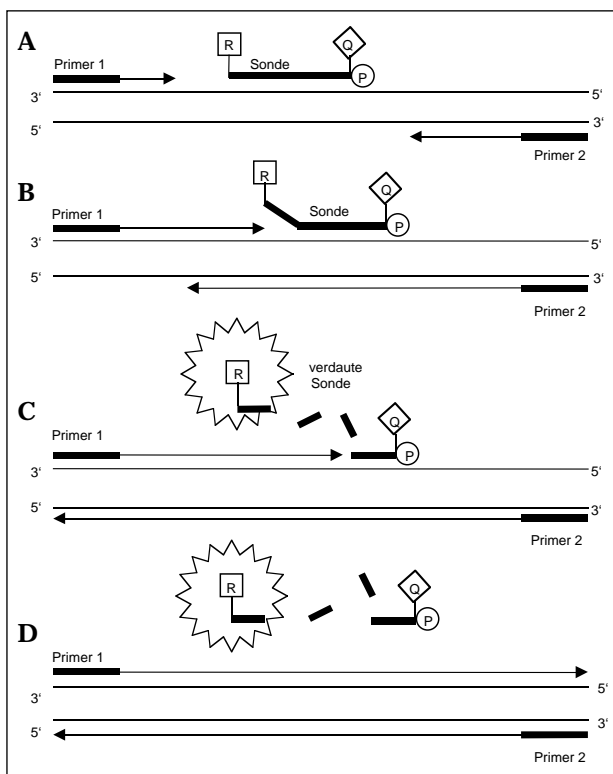


Abbildung 1: Diagramm der Real-Time TaqMan PCR: (A) PCR Primer 1 and 2 und die TaqMan Sonde, welche mit dem Reporter FAM (R) und dem Quencher TAMRA (Q) markiert ist, binden an die zu vermehrenden DNA Stränge. Solange die Sonde intakt ist, wird nach Blaulichtanregung die Fluoreszenz des Reporters vom Quencher absorbiert. Sobald die DNA Polymerase während der PCR das 3' Ende der Primers verlängert, hebt die Polymerase die Sonde vom Strang ab (B). Zusätzlich wird die Sonde aufgrund der Exonuklease-Aktivität der DNA Polymerase in Bruchstücke zerlegt (C). Durch das physische Entfernen des Reporters vom Quencher kann die Reporter-Fluoreszenz nun mittels Spektrophotometer nachgewiesen werden (D). Der Zyklus, bei welchem die Fluoreszenz über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der initialen Menge und kann deshalb direkt zur Quantifizierung verwendet werden.

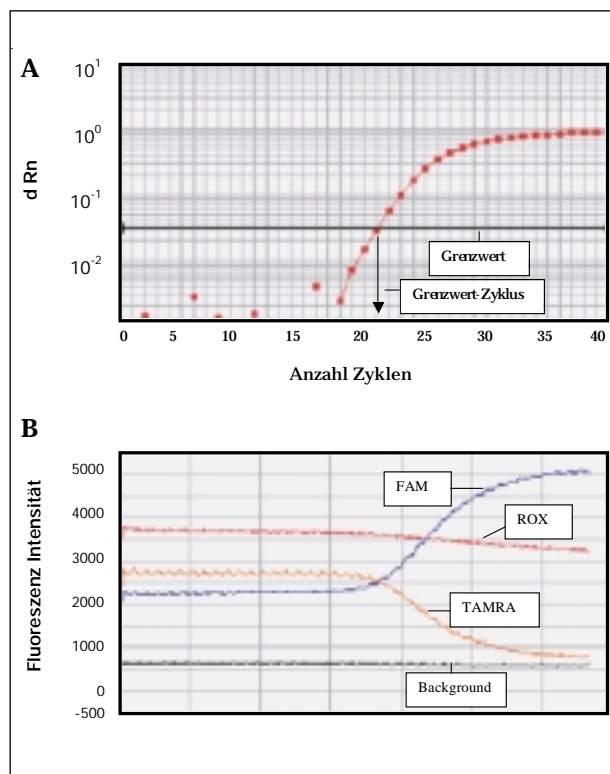


Abbildung 2: Ein positives TaqMan PCR Resultat kann auf zwei unterschiedliche Arten dargestellt werden. (A) Die Amplifizierungskurve gibt den Anstieg der Reporter-Fluoreszenz wieder, welche während der Vervielfältigung der Zielsequenz durch den Verdau der markierten Sonde freigesetzt wird. Bei zunehmender Fluoreszenz-Intensität übersteigt diese Kurve den Grenzwert, welcher die 10-fache Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz darstellt. Der Schnittpunkt der Fluoreszenz mit dem Grenzwert wird als Grenzwert-Zyklus bezeichnet (C_T -Wert; Cycle threshold). (B) Die zweite Art, ein TaqMan PCR Resultat darzustellen, wird durch die Auftrennung der beteiligten Fluoreszenzen erreicht (Multikomponenten-Darstellung). Beweisend für ein positives Resultat ist ein Ansteigen der Reporter- und ein Abfallen der Quencher-Fluoreszenz, welche beide parallel zueinander durch den Verdau der Sonde entstehen. Weitere Fluoreszenzen sind: ROX, welches als Farbstoff dem PCR-Puffer zur Normalisierung von Volumenschwankungen zugesetzt wird und die Background Fluoreszenz der individuellen Position in der 96-Loch Platte.

Kombination von PCR Thermocycler und einem Spektrophotometer können die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten TaqMan Sonden in Echtzeit während den Vermehrungszyklen nachgewiesen werden (Heid et al., 1996). Einen entscheidenden Vorteil erfährt dieses Prinzip durch den Verzicht auf den Elektrophoreseschritt, wodurch das Verfahren nicht nur wesentlich beschleunigt sondern auch gegenüber den gefürchteten Laborkontaminationen weitgehend geschützt wird. Zusätzlich beinhaltet das standardisierte PCR Reaktionsgemisch ein Enzymsystem, welches vor Kontamination mit PCR Produkten schützt (AmpErase UNG System; Pang et al., 1992). Die Resultate stehen als Grenzwert-Zyklus (C_T Wert, steht für Cycle Threshold: Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen Grenzwert übersteigt) und als Multikomponenten-Darstellung zur Verfügung (Abb. 2). Als weiterer wichtiger

Vorteil der Real-Time TaqMan PCR zählt die Möglichkeit der Quantifizierung: Die Anzahl Kopien des nachzuweisenden DNA Stückes kann in jeder Einzelprobe durch Vergleichen des Real-Time PCR Signals (C_T -Wert) mit demjenigen einer Standardkurve absolut bestimmt werden. Quantifizierung mit konventioneller PCR war nur durch die parallele Vervielfältigung derselben Probe in verschiedenen Ausgangsmengen oder in Konkurrenz mit einem internen Standard möglich. Die Parallelreaktionen haben dabei das Verarbeiten vieler Proben stark eingeschränkt. Die Real-Time TaqMan PCR ermöglicht das Arbeiten auf der Basis von international standardisierten 96-Loch Platten. Damit kombiniert die Real-Time PCR die Möglichkeit zur Quantifizierung mit schneller Analyse, geringen Verbrauchsmaterialkosten und höchster erreichbarer Sensitivität. Die

Real-Time TaqMan PCR kann in einem in sich abgeschlossenen System durchgeführt werden. Ein Softwarepaket ermöglicht die Standardisierung des PCR Prozesses. Damit können die verschiedensten Systeme während einer PCR Reaktion kombiniert und gleichzeitig ausgewertet werden. Die Rohdaten werden online in einem Computer gesammelt und stehen nach abgeschlossener PCR Reaktion für die Analyse bereit, welche in wenigen Minuten abgeschlossen werden kann.

Die Real-Time TaqMan PCR stellt einen weiteren wichtigen Schritt in der Entwicklung der PCR Technologie dar. Quantifizierung ist gegenwärtig bei den meisten PCR Anwendungen von Wichtigkeit, sowohl in der Forschung wie auch in diagnostischen Fragestellungen. Im Veterinärmedizinischen Labor und in Zusammenarbeit mit der Universität Kalifornien in Davis wurden in den letzten fünf Jahren mehr als 300 PCR Systeme auf dieses System adaptiert. Dabei wurden sowohl Systeme für die Genexpression in verschiedenen Spezies (Leutenegger et al., 1999b; Leutenegger et al., 1999c; Leutenegger et al., 2000) sowie auch für die Quantifizierung von Infektionserregern etabliert (Gut et al., 1999; Leutenegger et al., 1999d; Pusterla et al., 1999; Pusterla et al., 2000b). Darunter befinden sich Systeme zum Nachweis von zeckengebundenen Infektionserregern wie *Borrelia burgdorferi* (Leutenegger et al., 1999a), FSME-Virus (Wicki, et al., 2000), *Ehrlichia phagocytophila*-Genogruppe (Pusterla et al., 1999) und *Francisella tularensis* (Wicki et al., 2000). Mit der TaqMan PCR Methode können innerhalb weniger Tage mehrere Tausend Reaktionen durchgeführt und analysiert werden. Mit konventionellen Methoden müssten für den gleichen Arbeitsaufwand viele Wochen aufgewendet werden.

Diskussion

Die PCR Technologie hat sich im Bereich Forschung und Diagnostik bewährt und wird an Bedeutung weiter dazu gewinnen. Trotzdem hat die PCR auch neue Probleme mit sich gebracht. Aufgrund der hohen Sensitivität müssen PCR Resultate mit Vorsicht interpretiert werden. Dass die Interpretation schwierig sein kann, zeigt sich am Beispiel von subklinisch verlaufenden Infektionen. Für jeden PCR Nachweis eines Infektionserregers sollten deshalb die positiven und negativen prädiktiven Werte bekannt sein (Lutz and Winkler, 1995). Im Idealfall können diese Werte anhand einer grossen Anzahl Proben bestimmt werden, von denen bekannt ist, ob sie von infizierten oder nicht infizierten Patienten und Probanden stammen. Idealerweise sollten die Proben aus dem Einzugs-

gebiet stammen, in welchem das betreffende Labor PCR Diagnostik anbietet. Von diesen Analysen können die positiven und negativen prädiktiven Werte errechnet werden. Beträgt die diagnostische Spezifität 100%, bedeutet dies, dass die Erkrankung nicht in der gesunden Population gefunden wird und dass jedes positive PCR Resultat diagnostisch für die entsprechende Erkrankung ist. In diesem Idealfall wären PCR Resultate einfach zu interpretieren. In der Regel ist die diagnostische Spezifität jedoch kleiner als 100%, das heisst, man findet einzelne positive Werte auch in der Population der Gesunden. Um den positiven prädiktiven Wert für eine Infektionserkrankung zu berechnen, welcher als die Wahrscheinlichkeit definiert ist, dass ein positives PCR Resultat von einem erkrankten Individuum stammt, muss die Prävalenz der positiven PCR Resultate in der gesunden Population bekannt sein. Falls zum Beispiel in einer Population von 100 gesunden Individuen jeweils 4 Probanden (subklinisch Erkrankte) in der PCR positiv sind und gleichzeitig in der gleichen Gegend 4 Krankheitsfälle auftreten, dann sind von den 8 positiven Resultaten nur 4, also 50% mit der Erkrankung assoziiert. In diesem Fall beträgt der positiv prädiktive Wert für Erkrankung 50%. Bis anhin wurden solche positiven prädiktiven Werte für die PCR Diagnostik nur selten bestimmt (Lutz et al, 1999). Sie sind aber die Grundlage zur Interpretation von PCR Resultaten. Welchen Einfluss die Menge an nachweisbaren Krankheitserregern auf das klinische Bild hat, wurde in oben genannten Überlegungen nicht miteinbezogen. Es ist aber wahrscheinlich, dass die Quantifizierung von Infektionserregern in die Interpretation von PCR Resultaten miteinbezogen werden muss und dass die Quantifizierung neue Interpretationsmöglichkeiten bietet.

Bei der PCR Diagnostik kommt der Auswahl des korrekten Untersuchungsmaterials grosse Bedeutung zu. Als Beispiel sei hier die PCR Diagnostik der Borreliose erwähnt. Borrelien können in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, so zum Beispiel in der Haut, in Muskelgewebe, Synovia, Urin, aber auch im Plasma. Je nach Manifestation der Erkrankung kommt der Erreger in unterschiedlichen Geweben und Organen vor. So konnte zum Beispiel bei der Neuroborreliose und der Lyme Arthritis beim Menschen die Diagnose durch Nachweis der Erreger im Urin gestellt werden (Bayer et al., 1996), was bei der Haut-Borreliose nicht der Fall war: Bei der Haut-Borreliose können die Erreger nur selten im Urin nachgewiesen werden (Brettschneider et al., 1998). Bei den durch Zecken übertragenen Krankheiten der Haustiere liegen Informationen über die Verteilung des Erregers in verschiedenen Geweben

Tabelle 2: Spezifität der Genogruppen-spezifischen Real-Time TaqMan PCR Systeme der Ehrlichien anhand von typisierten Isolaten.

Erreger	Erkennung durch das Genogruppen-spezifische TaqMan System		
	<i>E. phagocytophila</i>	<i>E. sennetsu</i>	<i>E. canis</i>
<i>E. risticii</i> -Illinois	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -Kentucky	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -Ohio	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -SRC	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -SHSN	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -JUGA	nein	ja	nein
<i>E. risticii</i> -KLSN	nein	ja	nein
<i>E. sennetsu</i>	nein	ja	nein
<i>N. helminthocea</i>	nein	ja	nein
<i>E. equi</i> -MRK	ja	nein	nein
HGE-Webster	ja	nein	nein
HGE-BDS	ja	nein	nein
<i>E. phagocytophila</i>	ja	nein	nein
<i>A. marginale</i>	nein	nein	ja
<i>E. chaffeensis</i>	nein	nein	ja
<i>E. canis</i>	nein	nein	ja
<i>R. rickettsii</i>	nein	nein	ja
<i>R. typhi</i>	nein	nein	ja

E.: Ehrlichia; *N.*: Neorickettsia; *A.*: Anaplasma; *R.*: Rickettsia

nicht in allen Fällen vor. Zudem ist das krankmachende Potential verschiedener Erreger noch unklar. Als Beispiel sei *Borrelia burgdorferi* erwähnt: Die Pathogenese dieses Erregers wurde in mehreren experimentellen Studien abgeklärt. So ist auch bekannt, welches Material sich zum Nachweis der Infektion eignet (Straubinger, 2000). Neuere Untersuchungen über das Vorkommen von Borrelien in der Ostschweiz lassen vermuten, dass *Borrelia afzelii* offenbar häufig in Zecken vorkommt (eigene Untersuchungen). Ob allerdings *B. afzelii* beim Hund – ähnlich wie beim Menschen – ein spezifisches pathogenes Potential und damit auch ein anderes klinisches Bild hervorruft ist noch unklar.

Der analytischen Spezifität der verwendeten Systeme kommt eine weitere grosse Bedeutung zu. Falls die PCR Systeme apathogene Isolate nachweisen, wird die Interpretation zusätzlich erschwert. Eine hohe analytische Spezifität wurde für die von uns entwickelten Ehrlichien Real-Time TaqMan PCR Systeme angestrebt: Die drei vorhandenen Systeme können zuverlässig zwischen den drei sehr nahe verwandten Ehrlichien-Genogruppen unterscheiden (Tab. 2). Das Real-Time TaqMan PCR System zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi* sensu lato weist nur die drei für Europa klinisch relevanten Borrelien Isolate *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* und *B. afzelii* nach, jedoch keine anderen, nahe verwandten Borrelien (Leute-

negger et al., 1999a). PCR basierte diagnostische Methoden werden in naher Zukunft eine noch breitere Anwendung erfahren. Diese Methoden werden serologische Verfahren ergänzen oder sogar ersetzen. Neben dem diagnostischen Einsatz zur Erkennung von infizierten Patienten kommt der Kontrolle von latenten und/oder chronischen Infektionen eine besondere Bedeutung zu. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die TaqMan PCR auch über den Nachweis von Infektionserregern hinaus von diagnostischer Bedeutung ist: Sie kann auch in der Quantifizierung der Genexpression, zum Beispiel von Zytokinen oder für den Nachweis von genetischen Erkrankungen eingesetzt werden: Die Unterscheidung von Punktmutationen auf mutierten Allelen gegenüber Wildtyp Allelen ist mit der Real-Time TaqMan PCR Methode mit einer Treffsicherheit von 99.7% möglich und wird in Zukunft ein Einsatzgebiet mit hohem Stellenwert auch für die Veterinärmedizin darstellen.

Dank

CML wurde vom Schweizerischen Nationalfonds ein Stipendium für fortgeschrittene Forscher zugesprochen (No. 823A-53469). Teil dieser Studien wurde durch die UBS – im Namen eines Kunden – unterstützt.

Nouvelles méthodes de détection basées sur la biologie moléculaire avec comme exemple les agents infectieux transmis par les tiques

Les agents infectieux provoquant des zoonoses et transmis par les tiques sont connus en Europe depuis des décennies. Les représentants les plus importants pour la médecine vétérinaire et pour la médecine humaine sont la borréliose (ou Lyme disease), l'ehrlichiose et l'encéphalite méningée verno-estivale (FSME). Un dépistage à temps et un traitement rapide sont nécessaires pour éviter des séquelles ou même des décès. Le diagnostic clinique des maladies liées aux tiques, qui souvent est rendu difficile par une symptomatologie diversifiée, était établi jusqu'à maintenant, mis à part à l'aide des symptômes cliniques, sur la base de l'anamnèse de l'exposition aux tiques et sur la démonstration indirecte, parfois aussi directe à l'aide des méthodes immunologiques. La démonstration directe, basée sur des méthodes de biologie moléculaire, a amélioré le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses puisque qu'elle peut conduire à un diagnostic déjà pendant l'espace de temps entre l'infection et la séroconversion. Dans cet article, le diagnostic conventionnel des agents infectieux transmis par les tiques sont décrits. L'accent de ce travail repose sur un nouveau développement dans le diagnostic moléculaire – le Real-Time TaqMan®, la réaction polymérase en chaîne (PCR) et leur importance en rapport avec le diagnostic d'agents infectieux liés aux tiques.

Nuovi metodi di identificazione: l'esempio dell'agente infettivo legato alle zecche

Agenti infettivi trasmessi dalle zecche e responsabili di zoonosi sono conosciuti in Europa da decenni. Nella medicina veterinaria come pure nella medicina umana importanti esempi sono rappresentati dagli agenti patogeni della Borreliosi (Lyme Disease), dell'Ehrlichiosi e della meningoencefalite d'inizio estate (FSME). Un'individuazione tempestiva ed una terapia precoce sono fondamentali per impedire conseguenze ritardate o addirittura casi di morte. La diagnosi clinica delle malattie più importanti collegate alle zecche è spesso resa difficile dalla molteplicità dei sintomi e finora si basava, oltre che sui reperti clinici, sull'anamnesi dell'esposizione a zecche e sull'identificazione indiretta e qualche volta pure diretta dell'agente patogeno tramite metodi immunologici. L'identificazione dell'agente patogeno, che si basa su metodi di biologia molecolare ha migliorato notevolmente la diagnosi di diverse malattie infettive, dato che permette una diagnosi già nel periodo tra infezione e seroconversione. Nell'articolo presente vengono descritti brevemente gli agenti patogeni più importanti collegati alle zecche e la loro diagnosi convenzionale. In questo studio l'importanza maggiore viene data ad un nuovo metodo di diagnosi molecolare, il: Real-Time TaqMan® Polymerase Chain Reaction (PCR) – ed alla sua importanza in relazione alla diagnosi di agenti infettivi collegati alle zecche.

Literatur

Aeschlimann A., Chamot E., Gigon F., Jeanneret J.P., Kessler D., Walther C.: *B. burgdorferi* in Switzerland. Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiolog. Hyg. 1987, 263: 450–458.

Anderson B.E., Sumner J.W., Dawson J.E., Tzianabos T., Greene C.R., Olson J.G., Fishbein D.B., Olsen-Rasmussen M., Holloway B.P., George E.H.: Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1992, 30:775–780.

Barlough J.E., Madigan J.E., DeRock E., Bigornia L.: Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). Vet. Parasitol. 1996, 63:319–329.

Baumberger P., Krech T., Frauchiger B.: Development of early-summer meningoencephalitis (FSME) in the Thurgau region 1990–1995 – a new endemic area? Schweiz. Med. Wochenschrift. 1996, 126:2072–2077.

Bayer M.E., Zhang L., Bayer M.H.: *Borrelia burgdorferi* DNA in the urine of treated patients with chronic Lyme disease symptoms. A PCR study of 97 cases. Infection 1996, 24:347–353.

Bevanger L., Maeland J.A., Naess A.I.: Agglutinins and antibodies to *Francisella tularensis* outer membrane antigens in the early diagnosis of disease during an outbreak of tularemia. J. Clin. Microbiol. 1988, 26:433–437.

Biswas B., Dutta S.K., Mattingly-Napier B.: Gene amplification by polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia risticii* DNA in Potomac horse fever. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1990, 590:582–583.

Bouvier G., Burgisser H., Schneider P.A.: Premier cas de tularémie chez le lièvre en Suisse. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1951, 93:821–822.

- Bretschneider S., Bruckbauer H., Klugbauer N., Hofmann H.: Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. J. Clin. Microbiol. 1998, 36:2658–2665.
- Burgisser H.: Deuxième cas de tularémie en Suisse. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1974;116, 257–258.
- Christensen B.: An outbreak of tularemia in the northern part of central Sweden. Scand. J. Infect. Dis. 1984, 16:285–290.
- Dumler J.S., Asanovich K.M., Bakken J.S., Richter P., Kinsey R., Madigan J.E.: Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic Ehrlichia. J. Clin. Microbiol. 1995, 33:1098–1103.
- Evans M.E., Gregory D.W., Schaffner W., McGee Z.A.: Tularemia: a 30-year experience with 88 cases. Medicine 1985, 64:251–269.
- Fahrer H., Sauvain M.J., Zhioua E., Van Hoecke C., Gern L.E.: Longterm survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: what happens to the seropositive individuals? Europ. J. Epidem. 1998, 14:117–123.
- Francis E., Mayne, B.: Experimental transmission of tularemia by flies of the species *Chrysops discalis*. Pub. Health Rep. 1921, 36:1738–1746.
- Francis E.: The occurrence of tularemia in nature as a disease of man. Pub. Health Rep. 1921:36, 1731–8.
- Gresikova M., Sekeyova M., Stupalova S., Necas S.: Sheep milk-borne epidemic of tick-borne encephalitis in Slovakia. Intervirology 1975, 5:57–61.
- Gustafson R.: Epidemiological studies of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 1994, 92:1–63.
- Gut M., Leutenegger C.M., Huder J.B., Pedersen N.C., Lutz H.: One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. J. Virol. Methods 1999, 77:37–46.
- Haglund M., Forsgren M., Lindh G., Lindquist L.: A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: need for a vaccination strategy. Scand. J. Infect. Dis. 1996, 28:217–224.
- Halouzka J., Postic D., Hubalek Z.: Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. Med. Vet. Entomol. 1998, 12:103–105.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M.: Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996, 6:986–994.
- Hopla C.E.: The ecology of tularemia. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 1974, 18:25–53.
- Hubalek Z., Juricova Z., Halouzka J.: *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. Folia Parasitol. 1990, 37:255–260.
- Hubalek Z., Sixl W., Halouzka J., Mikulaskova M.: Prevalence of *Francisella tularensis* in Dermacentor reticulatus ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. Central Europ. J. Pub. Health 1997, 5:199–201.
- Iqbal Z., Chaichanasiriwithaya W., Rikihisa Y.: Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. J. Clin. Microbiol. 1994, 32:1658–1662.
- Labayru C., Palop A., Lopez-Urrutia L., Avellaneda C., Mazon M.A., Alberte A., Pascual P.P.: *Francisella tularensis*: update on microbiological diagnosis after an epidemic outbreak. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 1999, 17:458–462.
- Leutenegger C.M., Pusterla N., Mislin C.N., Weber R., Lutz H.: Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 1999a, 37:3390–3391.
- Leutenegger C.M., Mislin C.N., Sigrist B., Ehrenguber M.U., Hofmann-Lehmann R., Lutz H.: Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999b, 71:291–305.
- Leutenegger C.M., von Rechenberg B., Huder J.B., Zlinsky K., Mislin C., Akens M.K., Auer J., Lutz H.: Quantitative real-time PCR for equine cytokine mRNA in nondecalcified bone tissue embedded in methyl methacrylate. Calcif. Tissue Int. 1999c, 65:378–383.
- Leutenegger C.M., Klein D., Hofmann-Lehmann R., Mislin C., Hummel U., Böni J., Boretti F., Guenzburg W.H., Lutz H.: Rapid feline immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan fluorogenic real-time detection system. J. Virol. Methods 1999d, 78:105–116.
- Leutenegger C.M., Alluwaimi A.M., Smith W.L., Perani L., Cullor J.S.: Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan polymerase chain reaction. Vet. Immunol. Immunopathol. 2001, 77:275–287.
- Liebisch A.: Zur Übertragungsökologie der Zeckenenzephalitis in der Bundesrepublik. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse 1978, 2. Abhandlung.
- Long G.W., Oprandy J.J., Narayanan R.B., Fortier A.H., Porter K.R., Nacy C.A.: Detection of *Francisella tularensis* in blood by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993, 31:152–154.
- Lutz H., Winkler G.G.: The diagnostic specificity and sensitivity and the importance of disease prevalence. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1995, 137:237–242.
- Lutz H., Leutenegger C.M., Hofmann-Lehmann R.: The role of polymerase chain reaction and its newer developments in feline medicine. J. Fel. Med. Surg. 1999, 1:89–100.
- Magnarelli L.A., Dumler J.S., Anderson J.F., Johnson R.C., Fikrig E.: Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. J. Clin. Microbiol. 1995, 33:3054–3057.
- McCoy G.W.: A plague-like disease of rodents. Pub. Health Bull. 1911, 43:53–71.
- McCoy G.W., Chapin C.W.: *Bacterium tularensis*, the cause of a plague-like disease of rodents. Pub. Health Bull. 1912, 53:17–23.
- 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, 34:724–727.
- Muller A.: Active vaccination against early summer meningoencephalitis. Schweiz. Med. Wochenschrift 1998, 128:1110–1116.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1986, 63–73.
- Mullis K., and Faloona F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987, 155:335–350.
- Pang J., Modlin J., Yolken R.: Use of modified nucleotides and uracil-DNA glycosylase (UNG) for the control of contamination in the PCR-based amplification of RNA. Molecular & Cell. Probes. 1992, 6:251–256.
- Pearse R.A.: Insect bites. Northwest Med. 1911, 3:81.
- Penn R.L., Kinasewitz G.T.: Factors associated with a poor outcome in tularemia. Arch. Intern. Med. 1987, 147:265–268.
- Posthaus H., Welle M., Morner T., Nicolet J., Kuhnert P.: Tularemia in a common marmoset (*Callithrix jacchus*) diagnosed by 16S rRNA sequencing. Vet. Microbiol. 1998, 61:145–150.
- Pusterla N., Huder J.B., Leutenegger C.M., Braun U., Madigan J.E., and Lutz H.: Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 1999, 37:1329–1331.
- Pusterla N., Braun U., Leutenegger C.M., Reusch C., Lutz H.: Ehrlichiose in der Schweiz – Bedeutung für die Veterinärmedizin. Schweiz. Archiv Tierheilk. 2000a, 142:367–373.
- Pusterla N., Leutenegger C.M., Sigrist B., Chae J.-S., Lutz H., Madigan J.E.: Detection and quantitation of *Ehrlichia risticii* genomic DNA in infected horses and snails by real-time PCR. Vet. Parasitol. 2000b, 90:129–135.
- Ramelow C., Suss J., Berndt D., Roggendorf M., Schreier E.: Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods 1993, 45:115–119.
- Ristic M., Huxsoll D.L., Weisiger R.M., Hildebrandt P.K., Nyindo M.B.: Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. Infect. Immun. 1972, 6:226–231.
- Sanders C.V., Hahn R.: Analysis of 106 cases of tularemia. J. La State Med. Soc. 1968, 120:391–393.
- Schmidt B.L.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10:185–201.
- Scofield R.H., Lopez E.J., McNabb S.J.: Tularemia pneumonia in Oklahoma, 1982–1987. J. Okla. State Med. Assoc. 1992, 85:165–170.
- Sjostedt A., Eriksson U., Berglund L., Tärnvik A.: Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. J. Clin. Microbiol. 1997, 35:1045–1058.
- Straubinger R.K.: PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. J. Clin. Microbiol. 2000, 38:2191–2199.
- Tipold A., Fatzer R., Heimann H.: Central European tick-borne encephalitis in dogs. Kleintier Praxis 1993, 38:619–628.
- Truyen U., Stockhofe-Zurwieden N., Kaaden O.R., Pohlenz J.: A case report: encephalitis in lions. Pathological and virological findings. Dtsch. Tierarztl. Wochenschr. 1990, 97:89–91.
- Vereta L.A., Skorobrekha V.Z., Nikolaeva S.P., Aleksandrov V.I., Tolstonogova V.I., Zakharycheva T.A., Red'ko A.P., Lev M.I., Savel'eva N.A.: The transmission of the tick-borne encephalitis virus via cow's milk. Med. Parazitol. 1991, 3:54–56.
- Wändler A., Steck, F., Fankhauser, R., Kammermann, B., Gresikova, M., Blasovic, D.: Isolierung des Virus der zentraleuropäischen Zeckenenzephalitis in der Schweiz. Path. Microbiol. 1972, 8:258–270.
- Weber R., Pusterla N., Loy M., Lutz H.: Fever, leukopenia, and thrombocytopenia in a patient with acute Lyme borreliosis were due to human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Inf. Dis. 1998, 26:253–254.
- Weisenbock H., Holzmann H.: Immunohistochemical diagnosis of tick-borne encephalitis in Austrian dogs. Wien. Tierarztl. Mnsch. 1997, 84:34–38.
- Wicki R., Sauter P., Mettler C., Natsch S., Enzler T., Pusterla N., Kuhnert P., Egli G., Bernasconi M., Lienhard R., Lutz H., Leutenegger C.M.: A swiss army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. Europ. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. 2000, 20:427–432.
- Young L.S., Bicknel D.S., Archner B.G.: Tularemia epidemic: Vermont, 1968. Forty-seven cases linked to contact with muskrats. N. Engl. J. Med. 1968, 280:1253–1260.
- Zeman P.: *Borrelia*-infection rates in tick and insect vectors accompanying human risk of acquiring Lyme borreliosis in a highly endemic region in Central Europe. Folia Parasitol. 1998, 45:319–325.

Korrespondenzadresse

Dr. med. vet. Christian M. Leutenegger, Ph.D., FVH, School of Veterinary Medicine, Department of Medicine and Epidemiology, Lucy Whittier Molecular Cove Facility University of California, Davis, CA 95616, USA.

Manuskripteingang: 28. August 2000

In vorliegender Form angenommen: 20. März 2002