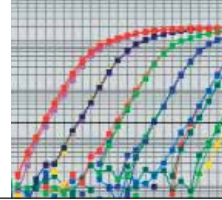


Beilage
August 2004



Ixodes ricinus und deren Bedeutung als Krankheitsüberträger

1/3



Die real-time PCR erlaubt eine schnelle und zuverlässige Bestimmung der Zellzahl von Hefen.

3/4

Zecken, deren Bakterien und Methoden zum Nachweis

Zecken aus der Region Zürich wurden mittels PCR und real-time PCR auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Dabei stand vor allem die Identifikation von *Borrelia burgdorferi sensu lato*, zu der die drei pathogenen in Europa vorkommenden Spezies *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* gehören, im Mittelpunkt.

Text: **STEFAN DREXLER¹, MARK JAEGGI², STEFANIE BANK¹ UND MARTIN SIEVERS²**



Abb. 1: *Borrelia afzelii*, 100fache Vergrößerung

Zecken aus der Region Zürich wurden mittels PCR und real-time PCR auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Dabei stand vor allem die Identifikation von *Borrelia burgdorferi sensu lato*, zu der die drei pathogenen in Europa vorkommenden Spezies *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* gehören, im Mittelpunkt.

Borrelia burgdorferi ist der Erreger der Lyme Borreliose, die inzwischen zu der am häufigsten durch Zecken übertragenen Krankheit in Europa und den USA zählt. Im Durchschnitt saugt eine Zecke ca. 8 ml Blut pro Nahrungsaufnahme, wodurch die Übertragung von Krankheitserregern im Zeitraum nach 12 h stattfindet (Sonenshine, D. 1991). Als Quelle von Borrelien gelten vor allem Nager (*Borrelia burgdorferi sensu stricto* und *Borrelia afzelii*) und Vögel (*Borrelia garinii*). Das Genom von *Borrelia burgdorferi sensu lato* besitzt ein lineares Chromosom von 910'725 bp und 11 sowohl lineare wie auch zirkuläre Plasmide, auf denen insgesamt 853 Gene kodiert sind (Fraser et al. 1997, Nature; Vol. 390; 580-586).

Die Genotypen von *Borrelia burgdorferi sensu lato* sind Gram-negativ und gehören zur Familie der *Spirochaetaceae* (Abbildung 1).

Die Oberflächenproteine von *Borrelia burgdorferi* wie z.B. *ospA* dienen zur Anlagerung im Zeckendarm. *Borrelia burgdorferi* stellt die Genexpression in der Zecke von *ospA* ein und exprimiert *ospC* um sich vom Mitteldarm der Zecke zu lösen und in die Speicheldrüse zu emigrieren. Um den Wirt zu infizieren, müssen mindestens 300 Bakterien den Übergang in die Dermis des Wirts bewältigen. *Borrelia afzelii* ruft Symptome von Akrodermatitis chronica atrophicans hervor. *Borrelia garinii* wird mit neurologischen Symptomen in Zusammenhang gebracht, die ebenfalls gehäuft in Europa auftreten, und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* führt zu Arthritis, welches die häufigste Form in den USA darstellt. Eine Hautrötung bei einem Zeckenbefall kann als Indiz für eine Infektion beobachtet werden. Therapiemethoden beschränken sich im Moment auf die Verabreichung von Antibiotika wie z.B. Tetracyclin.

Zeckenmorphologie

Die Zecken wurden in der Region Zürich (Hirzel, Sihlwald) nach der Cloth-Drugging-Methode gesammelt. Dabei hängen sich die Zecken

an den vom Sammler getragenen weißen Schutzanzug und können in einem Falcon-Röhrchen aufgenommen werden. Abbildung 2 zeigt das Sammeln von Zecken durch die Cloth-Drugging-Methode. Es wurden insgesamt 50 Zecken gesammelt: 36 Adulte (15 männlich, 21 weiblich) und 14 Nymphen.

Schwerpunkt dieser Arbeit lag dabei auf den adulten Zecken, von den Nymphen wurde eine Zecke untersucht. In der Abbildung 3 ist eine adulte weibliche Zecke (4 mm lang) mit rotem Hinterkörper, eine adulte männliche Zecke (2 mm lang) und eine Zecke im Nymphenstadium (1 mm lang) mit transparentem Hinterkörper in der Rückenansicht dargestellt. Bei den männlichen Zecken bedeckt das in der Regel schwarze Schild im Gegensatz zu der weiblichen Zecke den gesamten Körper.

Die Sequenzierung des 18S rRNA Gens der Zecken bestätigte die Ergebnisse der morphologischen Bestimmung der Zeckenart. Bei den gesammelten Zecken handelte es sich um *Ixodes ricinus*.



Abb. 2: Sammeln von Zecken nach der Cloth-Drugging-Methode



Abb. 3: Adulte weibliche Zecke, links, adulte männliche Zecke, mitte, und Zecke im Nymphenstadium, rechts

Identifikation von Bakterien aus Zecken

Die Zecken wurden mittels PCR und anschließender Sequenzierung der 16S rDNA auf das Vorhandensein von Bakterien untersucht. Von den 34 getesteten Zecken wiesen 21 (62%) eine Infektion durch Bakterien auf, 3 Zecken (9%) waren mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato infiziert, 2 Zecken (6%) mit *Ehrlichia* und 2 Zecken (6%), eine davon Nymphe, mit *Rickettsia*. Die Infektionen von Zecken mit Bakterien geschieht demzufolge nicht im adulten Stadium, sondern bereits nach der ersten Aufnahme von meist Nagetier-Blut im Nymphenstadium. 11 ausschliesslich weibliche Zecken waren von dem Bakterium *Ixodes ricinus* Endosymbiont 1 (*IricES1*) befallen. Es wurde lediglich eine Koinfektion zwischen *IricES1* und *Ehrlichia* nachgewiesen. Von den drei Zecken waren je eine Zecke mit *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* infiziert und eine mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Die Kontamination von Zecken mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato liegt in der Schweiz bei 27% und mit *Ehrlichia* durchschnittlich bei 1% (Wicki, R., 2000). Die Infektionsrate von *Ixodes ricinus* mit *Rickettsia* in der Schweiz liegt bei 10,3% (Burgdorfer, 1979). Koinfektionen der Zecke mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato und *Ehrlichia* (Erreger der Ehrlichiose) konnten von Leutenegger et al. (1999) nachgewiesen werden.

Der von Sacchi et al. (2003) beschriebene *Ixodes ricinus* Endosymbiont 1 ist zwischen der inneren und äußeren Membran von Mitochondrien der Oocyten lokalisiert. *IricES1* zersetzt und ernährt sich von der Membran des befallenen Mitochondriums. Allerdings entwickeln sich die Oocyten normal weiter, da nur ein Teil der Mitochondrien befallen wird. Bisher wurden *IricES1* ausschliesslich in weiblichen *Ixodes ricinus*

nachgewiesen. Auch in dieser Arbeit waren lediglich weibliche Zecken mit *IricES1* befallen. Über die humane Pathogenität dieses Bakteriums ist bisher nichts bekannt.

Identifikation von *Borrelia burgdorferi* sensu lato mittels real-time PCR

Die 34 Zecken wurden mit real-time-PCR unter Verwendung von SYBR Green auf Infektion mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato überprüft. Der Nachweis beruhte auf dem *ospA* Gen. Die verwendeten Primer (Primer: *ospAb_f* 5'-GGT YTA ATA TTA GCC TTA ATA GCA-3', *ospAb_r* 5'-CTT GTC TAC TGT TGC MWT TAG A-3') basieren auf Sequenzvergleichen des *ospA*-Gens der verschiedenen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Stämme.

Beim Nachweis über das *ospA* Gen konnten aus fünf Zecken *Borrelia burgdorferi* sensu lato nachgewiesen werden. Abbildung 4 zeigt die Schmelzpunktanalyse der real-time PCR Amplifikate von *Borrelia garinii* DSM 10534 (74.4°C), *Borrelia afzelii* DSM 10508 (76.6°C) und *Borrelia burgdorferi* DSM 4680 (76.9°C). Die Schmelzpunkte der positiv getesteten Zecken lagen zwischen 75.7°C und 76.7°C.

Als Vergleich zum *ospA*-System wurde ein weiterer real-time-PCR Nachweis beruhend auf dem *flaA*-Gen, kodierend für Flagellin, (Primer: *flaA_f* 5'-AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A-3', *flaA_r* 5'-GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA-3') basierend auf der Publikation von Schwaiger et al. (2001) durchgeführt. Beim Nachweis von *Borrelia burgdorferi* sensu lato durch das *flaA*-Gen wurden acht Zecken positiv getestet. Die Konzentrationen der nachgewiesenen *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Stämme in den Zecken lagen in dem

Bereich von 1.0×10^6 bis 4.9×10^3 Zellen/Zecke.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das *flaA*-Gen eine sensitive Methode zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi* sensu lato ist. Eine Unterscheidung der *Borrelia burgdorferi* sensu lato Genotypen ist nicht möglich. Das *ospA*-Gen ermöglicht jedoch über die Schmelzpunktcurve mittels SYBR Green eine Unterscheidung von *Borrelia garinii* und den beiden Genotypen *Borrelia afzelii* und *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Neben dem Flagellin A-Gen-

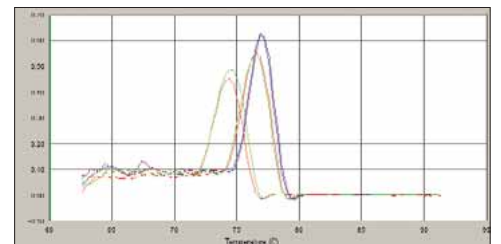


Abb. 4: Schmelzpunktcurven von *Borrelia garinii* DSM 10534 (grün/rot), *Borrelia afzelii* DSM 10508 (grün/rot) und *Borrelia burgdorferi* DSM 4680 (blau/lila) für das *ospA* Genamplifikat mit den Primern *ospAb_f* und *ospAb_r*

Nachweissystem gibt es erfolgreiche Studien basierend auf dem *p66* Gen als Nachweissystem (Mommert et al., 2001; Priem et al. 1998). Rauter et al. (2002) entwickelten eine real-time PCR-Nachweismethode für den LightCycler, welche die Unterscheidung der drei *Borrelia burgdorferi* sensu lato Genotypen ermöglicht.

Weiterführende Arbeiten im Rahmen von Netzwerkprojekten würden sich auf das Einsammeln einer statistisch relevanten Anzahl von Zecken konzentrieren sowie eine Optimie-

- 1 Fachhochschule Furtwangen, Jakob-Kienzle-Str. 17, 78054 Villingen-Schwenningen, Deutschland
- 2 Hochschule Wädenswil, Grüental, 8820 Wädenswil, Schweiz
Autor für Korrespondenz:
Prof. Dr. Martin Sievers, Hochschule Wädenswil, Molekularbiologie, Postfach 335, CH-8820 Wädenswil, Tel.: 0041 (0) 17899716, Email: m.sievers@hsw.ch

zung des Nachweissystems der einzelnen *Borrelia burgdorferi* sensu lato Genotypen und die Identifikation weitere Bakterienarten in Zecken zum Ziel haben. Eine unmittelbare Analyse der Zecken nach dem Entfernen vom Wirt mittels real-time PCR ist aus medizinischen Gesichtspunkten empfehlenswert und bietet einen Hinweis auf das Vorhandensein von pathogenen Bakterien.

Danksagung

Tobias Wermelinger, Christina Uermösi, Nicola Di Maiuta und Raphael Jaeggi (Hochschule Wädenswil) danken wir für die Mithilfe beim Einsammeln der Zecken und für die methodische Unterstützung. ◀

LITERATUR

- Burgdorfer, W.; Aeschlimann, A.; Péter, O.; Hayes, S.F., Philip, R.N. (1979): *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. Acta Trop. 36, 357-367
- Leutenegger, C.M., Pusterla, N., Mislin, C., Weber, R., Lutz, H. (1999): Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 3390-3391.
- Mommert, S.; Gutzmer, R.; Kapp, A.; Werfel, T. (2001): Sensitive Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu lato DNA and Differentiation of *Borrelia* Species by Light Cycler PCR. J. Clin. Microbiol. 39, 2663-2667
- Priem, S., Burmester, G.R., Kamradt, T., Wolbart, K., Rittig, M.G., Krause, A. (1998): Detection of *Borrelia burgdorferi* by polymerase chain reaction in synovial membrane, but not in synovial fluid from patients with persisting Lyme arthritis after antibiotic therapy Ann. Rheum. Dis. 57, 118-121.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M., Hartung, T. (2002): Distribution of clinically relevant *Borrelia genospecies* in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 36-43.
- Sacchi, L.; Bigliardi, E.; Corona, S.; Beninati, T.; Lo, N.; Franceschi, A. (2003): A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. Tissue and Cell 36, 43-53
- Sonenshine, D. (1991): Biology of the ticks. Vol. 1, 13-49
- Schwaiger, M.; Péter, O.; Cassinotti, P. (2001): Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. Clin. Microbiol. Infect. Vol. 7, 461-469
- Wicki, R.; Sauter, P.; Mettler, C.; Natsch, A.; Enzler, T.; Pusterla, P.; Kuhnert, P.; Egli, G.; Bernasconi, M.; Lienhard, R.; Lutz, H.; Leutenegger, C.M. (2000): 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. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19, 427-432.

Neue Wege bei der Identifizierung und Quantifizierung von Hefen

Hefen sind für den Menschen von grosser Bedeutung. Einerseits spielen sie eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Lebensmitteln, andererseits können Hefen als Kontaminanten Lebensmittel verderben oder als Pathogene Infektionen hervorrufen. Eine rasche, sichere Identifizierung und die Kenntnis der vorhandenen Zellzahl sind daher von grossem Interesse. Die quantitative real-time PCR ist den traditionellen Methoden, die auf mikrobiologischen, mikroskopischen und biochemischen Techniken beruhen, bezüglich Schnelligkeit und Aussagekraft klar überlegen.

Text: **SERGIO SCHMID**

Sowohl quantitativ als auch im Hinblick auf die wirtschaftliche Bedeutung sind Hefen die wichtigsten vom Menschen genutzten Mikroorganismen. Die grosse Bedeutung der Hefen wird deutlich, wenn man sich den alltäglichen Konsum von Brot und anderen fermentierten Lebensmitteln und Getränken wie Käse, Bier und Wein vor Augen führt. Vom ökonomischen Standpunkt aus besehen sind sowohl die nützlichen als auch die schädlichen Eigenschaften der Hefen von grossem Interesse. Bereits seit Jahrtausenden werden Hefen zur Produktion von Lebensmitteln und Getränken eingesetzt. Mit der Entwicklung der Fermentationsindustrie und der Biotechnologie wurden unter Verwendung von Hefen zunehmend auch hochwertige Produkte der pharmazeutischen und chemischen Industrie erzeugt. Allerdings können Hefen als Kontaminanten Lebensmittel verderben und dadurch immense wirtschaftliche Verluste verursachen oder als Pathogene bei Mensch und Tier Infektionen hervorrufen.

Die Taxonomie der Hefen ist sehr komplex und wird ständig modifi-

ziert, da neue Spezies entdeckt und neue Erkenntnisse über die Mikroorganismen erlangt werden.

Für viele Hefen existieren zahlreiche Synonyme, da z.B. die selbe Art von mehreren Forschern etwa zur gleichen Zeit unter verschiedenen Namen beschrieben wurde. Oft werden einzelne Spezies auch aufgrund neuer Erkenntnisse in andere Untergruppen verschoben. Daher kann die Taxonomie der Hefen mitunter schwierig und verwirrend erscheinen. Früher beruhte die Identifikation und Klassifizierung der Hefen auf morphologischen, physiologischen und biochemischen Eigenschaften der Zellen, wie beispielsweise Zell-, Ascosporen- und Koloniform, Art der Vermehrung, Ploidie, Fähigkeit zur Vergärung oder Assimilation bestimmter Zucker, Nutzung bestimmter Stickstoffquellen, Vitaminbedarf, Toleranz hoher Salz- oder Zuckerkonzentrationen und Temperatur-Sensitivität.

Um aufgrund dieser Merkmale eine verlässliche Identifikation der Spezies zu erhalten, müssen normalerweise ca. 60-90 Tests durchgeführt werden, was in der Regel eine bis drei Wochen Zeit in Anspruch nimmt.

Mit diesem enormem Zeit- und Arbeitsaufwand sind z.B. Routineanalysen in grösserem Umfang äusserst mühsam.

Eine Revolution der Taxonomie und der Möglichkeit der Identifikation vollzog sich mit der Einführung neuer molekularbiologischer Methoden. Mit diesen neuen Techniken können nun auch Proteinzusammensetzung, immunologische Eigenschaften und Nukleinsäureanalysen der Hefen zur Identifikation und Klassifizierung herangezogen werden. Besonders hervorzuheben ist hier die DNA-Analytik, die eine sehr schnelle und spezifische Bestimmung der Spezies erlaubt und zusätzlich Studien zur verwandtschaftlichen Beziehung zwischen den Hefen ermöglicht.

Für die Identifikation einer Hefeart verwendet man häufig die ITS-Regionen. Die dafür verwendeten Sequenzen variieren von Art zu Art. Die artspezifischen Sequenzunterschiede können mit Techniken wie PCR-RFLP oder DNA-Sequenzierung bestimmt werden. Die grösste Aussagekraft erreicht man durch Sequenzieren dieser Region und anschliessendem Vergleich mit Sequenzen, die in Datenbanken hinterlegt sind. Wenn es sich beim Probematerial nicht um eine Reinkultur handelt, muss der molekularbiologischen Identifikation eine kulturelle Etappe vorgeschaltet werden, die eine Vereinzellung der Hefen auf Agarplatten ermöglicht.

Die Analyse der ITS-Sequenzen gestattet eine Identifikation der Hefeart, sie erlaubt jedoch keine quantitative Aussage über die im Probematerial vorhandene Zellzahl. Die Zellzahl muss kulturell oder mikroskopisch bestimmt werden. Bei Vorliegen einer Mischflora ist die quantitative Bestimmung der Zusammensetzung mit diesen Methoden äusserst mühsam und zeitaufwendig.

Als Methode der Wahl bieten sich hier real-time PCR Verfahren an. Die real-time PCR für die quantitative Bestimmung der Hefearten zeichnet sich durch ihre hohe Spezifität und Reproduzierbarkeit, kurze Analysendauer und geringe Analysenkosten, Robustheit sowie einfache Auswertung aus. Für jede Hefeart wird ein spezifisches Nachweissystem benötigt. Als Zielsequenz für die quantitative PCR sind die erwähnten ITS-Regionen leider nicht geeignet, da diese DNA-Sequenzen in den Zellen in nicht definierter Kopienzahl vorlie-

gen. Daher müssen andere Sequenzen gefunden werden, die möglichst auf *single-copy*-Genen liegen.

Das ISO17025 akkreditierte Labor für Molekularbiologie der Hochschule Wallis hat eine grosse Erfahrung auf dem Gebiet der Entwicklung und Validierung von Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen mit real-time PCR. Die im folgenden aufgeführten Verfahren, die alle von uns entwickelt wurden, erlauben den spezifischen und quantitativen Nachweis der entsprechenden Hefen innerhalb von 6 Stunden nach Probeneingang.

Beispiel: SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Saccharomyces cerevisiae ist von grosser wirtschaftlicher Bedeutung. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Stämme dieser Hefeart, die als Back-, Brau- oder Weinhefen eingesetzt werden.

In unserem Nachweisverfahren verwenden wir das Actin-Gen, ein sogenanntes *housekeeping* Gen als Zielsequenz für die real-time PCR. Das Prüfverfahren wurde für die Lebensmittelmatrix Wein validiert. Die neue Methode zeichnet sich durch eine gute Nachweisgrenze (100 Zellen/ml), einen grossen linearen Bereich (100 bis 108 Zellen/ml) und eine hohe Spezifität aus.

Beispiel: CANDIDA UTILIS

Candida utilis ist vermutlich die am weitesten verbreitete Hefespezies zur Herstellung von Futterhefe und Single Cell Protein. Mit teilweise über 55% der Gesamtzellmasse ist der Proteingehalt der Hefe sehr hoch. Das Protein weist ein gutes Aminosäuren-Profil auf und besitzt einen hohen Nährwert. Neben der Verwendung als Nähr- und Futterhefe wird *C. utilis* bei der Herstellung von

Hefeextrakt und Hefeautolysaten und bei der Produktion von Lipiden eingesetzt. Sie vermag auch Xylose und Arabinose (einfache Zucker mit fünf Kohlenstoffatomen) zu verwenden, so dass man sie auf den Sulfitablaugen der Zellstoffindustrie heranzüchten kann.

Es zeigte sich, dass die gewählte Zielsequenz sich ausgezeichnet zum Nachweis von *C. utilis* eignet. Das System zeichnet sich durch eine hervorragende Spezifität aus und erlaubt daher die selektive Bestimmung von *C. utilis*. Die Analyse von DNA-Verdünnungsreihen zeigte eine sehr gute Linearität. Die Nachweisgrenze ist sehr niedrig und liegt im Bereich von 10 bis 50 Zellen/ml (Abbildung 2).

Beispiel: CANDIDA TROPICALIS

Candida tropicalis wird überwiegend zur Herstellung von Futterhefe, z.B. auf Sulfitablaugen, eingesetzt, und hat die Fähigkeit, Alkane zu verwenden. In der Natur findet man *C. tropicalis* im Boden, in wässrigen Habitaten und auf Früchten. Die Art gilt als potentiell pathogen, und in den letzten Jahren scheinen durch *C. tropicalis* verursachte Infektionen häufiger aufzutreten.

Für die Bestimmung der Zielsequenz wurde dasselbe Gen wie für den *Candida utilis* Nachweis verwendet. Auch dieses System zeichnet sich durch einen grossen Linearitätsbereich, eine hohe Spezifität und eine tiefe Nachweisgrenze (ca. 100 Zellen/ml) aus. ◀

Dr. Sergio Schmid
Hochschule Wallis
Route du Rawyl 47
CH-1950 Sion
Telefon: +41 (0)276068653
E-mail: sergio.schmid@hevs.ch



Abb. 1: knospende *S. cerevisiae* Zelle

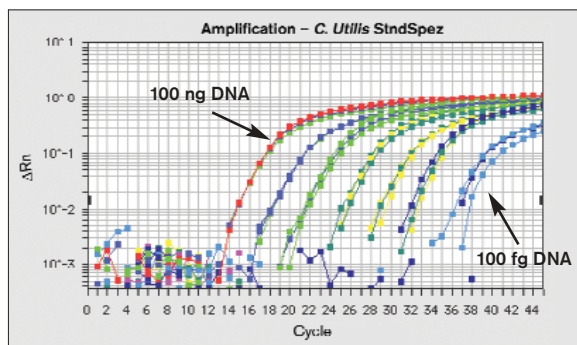


Abb. 2: Amplifikationsplots einer seriellen Verdünnungsreihe von *C. utilis*-DNA (Analyse von Triplikaten jeder Verdünnungsstufe).