

## Diagnostik

# Neuartiger Schnelltest für Rickettsien-Infektionen

ELMARA GRASER<sup>1</sup>, THOMAS TALASKA<sup>2</sup>, TIMO HILLEBRAND<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AJINNUSCREEN GMBH, BERLIN

<sup>2</sup>INSTITUT FÜR DURCH ZECKEN ÜBERTRAGBARE KRANKHEITEN E. V.,  
BRIESKOW-FINKENHEERD

Mit einem neuartigen molekulargenetischen Schnelltest für den Nachweis von Rickettsieninfektionen wurden Zecken im Land Brandenburg untersucht. Eine bisher in diesem geografischen Gebiet noch nicht gefundene Rickettsienart (*Rickettsia raoultii*) wurde in *Dermacentor reticulatus* identifiziert.

A novel sensitive and rapid molecular genetic test for detection of *Rickettsia* infection was developed. Ticks in the state of Brandenburg were screened to detect *Rickettsia* bearing ticks. The first finding of *Rickettsia raoultii* in the state Brandenburg has been detected in *Dermacentor reticulatus*.

■ Rickettsien sind kleine gramnegative intrazellulär lebende Bakterien, die sich an ein Leben im Darmepithel von Arthropoden (Läuse, Zecken, Flöhe, Milben) gut angepasst haben. Die Übertragung auf den Menschen geschieht über den Biss der Zecken und Milben sowie den Kot der Läuse oder Flöhe.

Das klinische Bild wird geprägt von Fieber, Kopfschmerzen, Benommenheit und einem

makulösen Exanthem. Bei den durch Biss übertragenen europäischen Rickettsiosen bildet sich dort oft an der Haut ein charakteristisches kleines Geschwür mit nekrotischem Zentrum als Primärläsion (*tache noire*). In der Pathogenese spielt der Befall von Endothelien kleiner Gefäße mit Hyperplasie, Nekrosen und Thrombosierung eine entscheidende Rolle. Durch lymphozytäre Infiltration bilden sich dort die Fleckfieberknötchen. Der

Austritt von Erythrozyten aus den geschädigten Gefäßen der Haut führt zum typischen Exanthem.

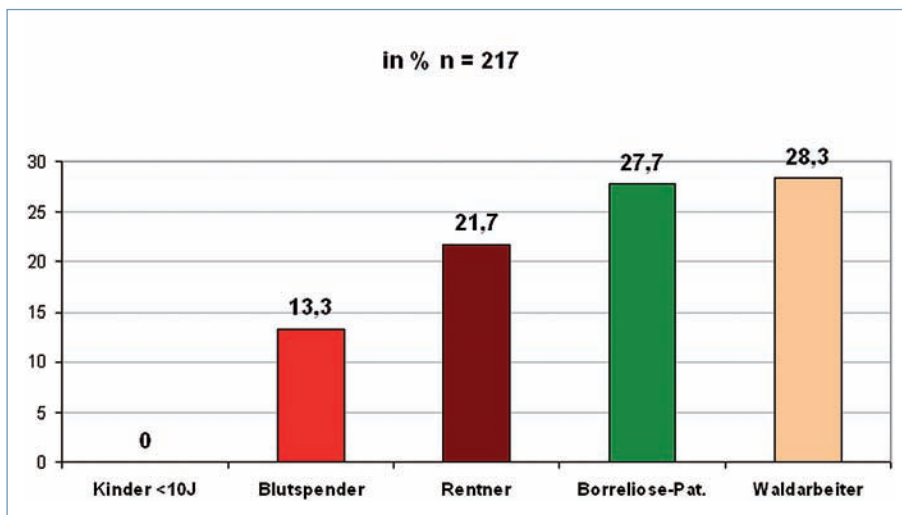
Das Fleckfieber war schon im Altertum häufig, so war wahrscheinlich die „Pest“ von Athen um 429 eine Rickettsien-Epidemie. In den napoleonischen Kriegen starben mehr Soldaten (ca. 125.000) an Läuse-Fleckfieber („Kriegstypus“) als durch Schlachten. Der Entdecker des Erregers, der Chicagoer Arzt H. T. Ricketts, starb 1910 – zehn Tage nach dem Erscheinen seiner „vorläufigen Mitteilung“ über das Vorkommen der Bakterien im Läuse Darm selbst an Fleckfieber.

Nach den Epidemien im und nach dem Zweiten Weltkrieg ist es still um diese Erkrankungen geworden, die im Zuge von Armut und schlechten hygienischen Bedingungen auftraten. Die Laus spielt in Mitteleuropa als Krankheitsüberträger kaum noch eine Rolle. Die durch Zecken übertragenen Rickettsiosen wurden jedoch lange Zeit unterschätzt, zumal die Morbidität und Mortalität deutlich unter der des Läuse-Fleckfiebers liegt.

Allenfalls wird gelegentlich noch an das Mittelmeerfieber nach entsprechendem Urlaubsaufenthalt gedacht; hier ist der Erreger *Rickettsia conori*, die Übertragung erfolgt durch den Stich von Zecken der Species *Rhipicephalus*.

Aktuell sind Krankheiten durch Rickettsien als Erreger für durch Zecken übertragene Erkrankungen wieder interessant geworden. Differenzialdiagnostisch müssen sie in Erwägung gezogen werden, wenn nach Zeckenbiss Symptome auftreten, die den bisher bekannten Krankheiten (FSME, Lyme-Borreliose, HGE, Babesiose) nicht zugeordnet werden können.

Neu als humanpathogen charakterisiert wurde *Rickettsia helvetica*. Diese Rickettsienart wurde von Zecken in der Schweiz, Frankreich und Slovenien isoliert, Vektor ist auch hier *Ixodes ricinus* (Gemeiner Holzbock). Nilsson *et al.* beschrieben Fälle, bei denen ein plötzlicher Tod von zwei jungen Patienten mit Perimyocarditis durch eine *R. helvetica*-Infektion eingetreten ist<sup>[1]</sup>. Fournier *et al.* berich-



▲ Abb. 1: IgG-Seroprevalenz für *Rickettsia helvetica* im Land Brandenburg.

ten über Infektionen mit *R. helvetica*, die klinisch relevant mit prolongiertem Fieber, Schwäche, Myalgien und Cephalgien verlaufen sind<sup>[2]</sup>.

Im Rahmen einer retrospektiven Studie in Berlin-Brandenburg ergab sich eine IgG-Seroprevalenz für *Rickettsia helvetica* von bis zu 28,3 % (**Abb. 1**). Die klinische Relevanz dieser Befunde muss noch geklärt werden.

Aktuelle Untersuchungen von Zecken aus Brandenburg ergaben, dass Rickettsien in den Zecken keine Rarität darstellen. So fanden wir in *Ixodes ricinus* bei 13 % Borrelien und bei 10 % *Rickettsia helvetica*. Die bei uns relativ neu auftretenden Auwaldzecken *Dermacentor reticulatus* waren nur zu 6 % mit Borrelien infiziert, aber bis zu 50 % mit Rickettsien (Graser und Hillebrand, nicht publizierte Ergebnisse).

A. Lakos (Budapest) und D. Raoult (Marseille) gelang es, *Rickettsia slovaca* als den Erreger der *tick-borne* Lymphadenopathie (TIBOLA) zu identifizieren<sup>[3]</sup>. Dieses Ergebnis in Zusammenhang mit der neuen Tatsache, dass die Auwaldzecken auch den Menschen beißen, konfrontiert uns potenziell mit einem neuen Krankheitsbild (**Tab. 1**).

Da die Diagnostik der „neuen“ und exotischen Rickettsiosen in Deutschland noch im Argen liegt, wird es auch in der nächsten Zeit kaum serologische Untersuchungsmöglichkeiten geben, die es erlauben, in der Routine bei auffälligen, aber nicht den bekannten *tick-borne diseases* zuordenbaren Symptomen nach Zeckenbiss eine schnelle und zuverlässige Diagnostik zu erhalten. Die Spezifität und Sensitivität der klassischen Weill-Felix-Reaktion ist zu gering, sie sollte im Archiv der mikrobiologischen Geschichte verschwinden. Es bestand somit Handlungsbedarf bei der Entwicklung neuer Tests. Aus diesem Grund wurde ein neues molekulargenetisches Nachweisverfahren entwickelt und getestet, welches es erlaubt, extrem

**Tab. 1:** In Europa vorkommende pathogene Rickettsien und ihre Überträger.

| Species              | Überträger (Zeckenarten)       | Krankheit           | Mortalität   |
|----------------------|--------------------------------|---------------------|--------------|
| <i>R. conori</i>     | <i>Rhipicephalus spec.</i>     | Mittelmeerfieber    | gering       |
| <i>R. helvetica</i>  | <i>Ixodes ricinus</i>          | Fieber, Cephalgien  | unbekannt    |
| <i>R. raoultii</i>   | versch. Dermacentorarten       | Lymphadenopathie    | unbekannt    |
| <i>R. slovaca</i>    | <i>Dermacentor marginatus</i>  | TIBOLA              | bisher keine |
| <i>R. sibirica</i>   | <i>Dermacentor reticulatus</i> | in Europa unbekannt | unbekannt    |
| <i>R. prowazeki</i>  | <i>Pediculus h. coporis</i>    | Fleckfieber         | sehr hoch    |
| <i>R. typhi</i>      | <i>Xenopsylla cheopis</i>      | Murines Fleckfieber | hoch         |
| <i>R. monacensis</i> | <i>Ixodes ricinus</i>          | unbekannt           | unbekannt    |

schnell und sensitiv Rickettsien-DNA nachzuweisen.

### Material und Methoden

Das entwickelte Nachweisverfahren kombiniert die Homogenisierung der Zecken mittels eines Homogenisators (SpeedMill C12; Analytik Jena AG) in speziellen Aufschlussgefäßen mit einer nachfolgenden effizienten Isolierung der DNA. Der spezifische und hochsensitive Nachweis der Rickettsien-DNA erfolgt mittels eines neuartigen Verfahrens (Rapid-Amplification-Hybridization). Dieses basiert auf einer gekoppelten Amplifikations-Hybridisierungsreaktion mittels der patentierten Rapid-PCR-Technologie (Analytik Jena AG). Der finale Nachweis einer Amplifikationsreaktion erfolgt dann mittels optischer Detektion auf einem Lateral-Flow-Teststreifen. Der gesamte Nachweis, einschließlich der DNA-Extraktion, ist innerhalb von weniger als zwei Stunden abgeschlossen. Das Verfahren wurde für die Untersuchung von 368 Zecken aus ausgewählten Gegenden in Brandenburg eingesetzt. Unter den 368 Zecken waren 340 Holzböcke (*Ixodes ricinus*) in verschiedenen Entwicklungsphasen und 16 adulte Auwaldzecken-Weibchen (*Dermacentor reti-*

*culatus*). In 40 Holzböcken und 8 Auwaldzecken wurde Rickettsien-DNA mittels des neuartigen Nachweisverfahrens nachgewiesen.

### Ergebnisse

Die Artzuordnung der Rickettsien-positiven Zecken erfolgte mittels Sequenzierung von zwei Systematik-relevanten Genen: das Citratsynthetase-Gen<sup>[4, 5]</sup> und das 16S-RNA-Gen<sup>[5, 6]</sup>. Alle Rickettsien aus *Ixodes ricinus* konnten mittels Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente (Citrat synthetase- und 16S-RNA-Gen) der Art *Rickettsia helvetica* zugeordnet werden (**Abb. 2A, B**).

Die aus Auwaldzecken isolierte Rickettsien-DNA ließ sich weder zu *R. helvetica* (das ist verständlich, da *R. helvetica* für Auwaldzecken nicht typisch ist) noch zu *R. slovaca* (im europäischen Raum verbreitet) zuordnen.

Einen Vergleich der gefundenen DNA-Sequenzen mit den Sequenzen anderer *Rickettsia*-Species (NCBI-Datenbank) zeigt **Abbildung 3**. Der Sequenzvergleich von taxonomisch relevanten Genabschnitten der Citratsynthetase (**Abb. 3A**) und der 16S-RNA (**Abb. 3B**) ergab, dass es sich bei den Rickettsien aus den Auwaldzecken um *Rickettsia raoultii*, strain Chabarovsk handelt<sup>[7]</sup>. Diese

**A** Rh TAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATTTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATA  
P1 TAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATTTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATA

Rh TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTTAAAGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATA  
P1 TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTTAAAGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATA

Rh TAAAAACTACGATCCACGTGCCGCACTTAAAGAAACTTTAAGGAAGTATTAAGGAA  
P1 TAAAAACTACGATCCACGTGCCGCACTTAAAGAAACTTTAAGGAAGTATTAAGGAA

Rh CTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAA  
P1 CTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAA

**B** Rh ACGCTATCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGACTAATTTGGGGCTTGCTCCAATTAG  
P1 .....AGTCGAACGGACTAATTTGGGGCTTGCTCCAATTAG

Rh TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTAAGGAATAACTTTTAGA  
P1 TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTAAGGAATAACTTTTAGA

Rh AATAAAGCTAATACCAATATATTCTCTATGGAGGAAAGATTTATCGCTGATGGATGAGCCCG  
P1 AATAAAGCTAATACCAATATATTCTCTATGGAGGAAAGATTTATCGCTGATG

▲ Abb. 2: Vergleich von A, Citratsynthetase-Sequenzen und B, 16S-RNA-Sequenzen aus *Rickettsia helvetica* (Rh) und einer Probe aus einer *Ixodes ricinus*-Zecke (P1). Die für *R. helvetica* typischen DNA-Abschnitte sind unterstrichen.

**A** Rsi CTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATA  
Rr CTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATA  
P2 CTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATA

Rsi TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCATTTAGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATA  
Rr TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCATTTAGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATA  
P2 TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCATTTAGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATA

Rsi TAAAAACTATGACCCGCGTGCCGCACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGTATTAAGGAA  
Rr TAAAAACTATGACCCGCGTGCCGCACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGTATTAAGGAA  
P2 TAAAAACTATGACCCGCGTGCCGCACTTAAAGAAACGTGCAAGAAAGTATTAAGGAA

Rsi CTCGGGCAGCTAGACAACAAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAA  
Rr CTCGGGCAGCTAGACAACAAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAA  
AGCTAGACAACAAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAA

**B** Rsi ACGCTATCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGACTAATTTGGGGCTTGCTCCAATTTA  
Rr ACGCTATCGGTATGCTTAAACACATGCAAGTCGAACGGACTAATTTGGGGCTTGCTCCAATT.A  
P2 .....TGCAAGTCGAACGGACTAATTTGGGGCTTGCTCCAATT.A

Rsi GTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTAAGGAATAACTTTTAGA  
Rr GTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTAAGGAATAACTTTTAGA  
P2 GTTAGTGGCAGACGGGTGAGTAACACGTGGGAATCTACCCATCAGTAAGGAATAACTTTTAGA

Rsi AATAAAGCTAATACCGCTATATTCTCTGCGGAGGAAAGATTTATCGCTGATGGATGAGCCCG  
Rr AATAAAGCTAATACCGCTATATTCTCTGCGGAGGAAAGATTTATCGCTGATGGATGAGCCCG  
P2 AATAAAGCTAATACCGCTATATTCTCTGCGGAGGAAAGATTTATCGCTGATG

▲ Abb. 3: A, Vergleich von Citratsynthetase-Sequenzen aus *Rickettsia sibirica* (Rsi) und *R. raoultii* strain Chabarovsk (Rr) mit einer Probe aus einer Auwaldzecke (P2). B, Vergleich von 16S-RNA-Sequenzen aus *Rickettsia sibirica* (Rsi) und *R. raoultii* strain Chabarovsk (Rr) mit einer Probe aus einer Auwaldzecke (P2). Die typischen DNA-Abschnitte sind unterstrichen, der Unterschied zwischen *R. slovacica* und der Probe ist pink hervorgehoben.

matik nach einem Zeckenbiss auch eine Infektion mit Rickettsien in Betracht zu ziehen. Mit dem neuartigen molekulargenetischen Test ist dafür nun auch ein effizientes und spezifisches Detektionssystem verfügbar. Die Einfachheit der Methodendurchführung und ihr sehr geringer Geräteaufwand machen sie auch für ein normales ärztliches Labor geeignet. ■

**Literatur**

[1] Nilsson, K., Lindquist, O., Pålsson, C. (1999). Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet*. 354: 1169–1173.  
[2] Fournier, P. E., Grunnenberger, F., Jaulhac, B., Gastinger, G., Raoult, D. (2000): Evidenz of *Rickettsia helvetica* Infection in Humans, Eastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 6: 389–392.  
[3] Lakos, A. (1997): Tick-borne lymphadenopathy a new rickettsial disease? *Lancet*. 350: 1006.  
[4] Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M., Raoult, D. (1997): Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the Rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 252–261.  
[5] Fournier, P.-E., Fujita, H., Takada, N., Raoult, D. (2002): Genetic Identification of Rickettsiae Isolated from Ticks in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2176–2181.  
[6] Roux, V., Raoult, D. (1995): Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. *Res. Microbiol.* 146: 385–396.  
[7] Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., Davoust, B., Tarasevich, I., Brouqui, P., Fournier, P. E. (2008): *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1635–1639.

**Korrespondenzadresse:**



Dr. Elmara Graser  
Dr. Timo Hillebrand  
AJInnuscreeen GmbH  
Robert-Rössle-Straße 10  
D-13125 Berlin  
Tel.: 030-9489-3380  
Fax: 030-9489-3381  
e.graser@aj-innuscreeen.de

Rickettsienart, die zu der humanpathogenen *spotted fever group* gehört, wurde in Brandenburg (und möglicherweise in Deutschland) bisher noch nie nachgewiesen.

**Diskussion**

Mit dem beschriebenen neuartigen molekulargenetischen Test wurde ein Verfahren entwickelt, welches sensitiv und schnell den

Nachweis von Rickettsieninfektionen ermöglicht. Die Nutzung des Tests für die Untersuchung von Zecken im Land Brandenburg ergab neben der Aussage über die Infektionshäufigkeiten auch den Nachweis einer bisher für dieses geografische Gebiet noch nicht gefundenen Rickettsienart (*Rickettsia raoultii*). Dieser Fund unterstreicht einmal mehr die Problematik, bei unklarer Sympto-