

Ber. nat.-med. Verein Innsbruck	Band 81	S. 223 – 227	Innsbruck, Okt. 1994
---------------------------------	---------	--------------	----------------------

Erst-Isolation des Q-Fieber Erregers *Coxiella burnetii* aus *Ixodes ricinus* – Zecken in Tirol (Österreich) (Ixodides)

von

B. KAASERER, J. REHACEK, J. URVÖGLY, E. KOVACOVA, M. LUKACOVA & E. KOCIANOVA *)

First Isolation of the Q-Fever Agent, *Coxiella burnetii*, in *Ixodes ricinus* – Ticks in Tyrol (Austria) (Ixodides)

Synopsis: Q-fever has been known in many European countries including Austria since World War II. In contrast to the relatively high prevalence of antibodies in men and animals, recorded primarily in Burgenland and in Tyrol, Q-fever outbreaks and cases of disease seem to have no importance in Austria up to now.

In the summer of 1990 a representative number of *Ixodes ricinus* ticks were gathered from various localities in Tyrol in an attempt to recover *Coxiella burnetii* and close the gap in rickettsiological research in Austria.

Ticks were screened for rickettsial organisms by the haemocyt test and positive arthropods were homogenized individually or in pools of 2 - 4 specimens into saline suspensions. They were again inoculated into yolk sacs of 6 - 7 days old imbrionated hen eggs to isolate rickettsiae. The isolated rickettsial strains were then cultivated in yolk sacs of eggs and intracoelomally inoculated in partially engorged femal *Dermacentor reticulatus*-ticks which had been fed on healthy rabbits.

Two strains of *Coxiella burnetii* were isolated from *Ixodes ricinus* ticks collected in the alpine region of Tyrol. They are the first Q-fever strains isolates in Austria. Strain no. 5 was isolated from ticks collected at an altitude above 1000 m a.s.l.

The isolated strains of rickettsiae were taxonomically identified by complement fixation, indirect immunofluorescence, ELISA, SDS-Page and Immunoblotting.

These strains belong to the group of agents causing acute forms of Q-fever. The discovery of *Coxiella burnetii* in *Ixodes ricinus* ticks confirms our results of previous serological investigations of men and animals in the alpine region of North-Tyrol.

1. Einleitung:

1935 wurde von DERRICK in Queensland (Australien) eine neue Infektionskrankheit beschrieben. DERRICK benannte diese Krankheit auf Grund ihrer unbekanntes Ätiologie, Q-Fieber, wobei sich "Q" von "query" ableitet (DERRICK 1937). In Europa wurde Q-Fieber erstmals während des Zweiten Weltkrieges am Balkan festgestellt. CAMINOPETROS isolierte den Erreger 1943 aus einem Patienten in Athen. Die von den deutschen Truppen als Balkangrippe bezeichnete Krankheit verursachte zwar keine Todesfälle, führte aber zu hohen Ausfällen bei Freund und Feind.

*) Anschrift der Verfasser: Dr. B. Kaaserer, Vorderstadt 5, A-6370 Kitzbühel, Österreich; J. Rehacek, J. Urvögly, E. Kovacova, M. Lukacova und E. Kocianova, Institut für Virology der slovakischen Akademie für Wissenschaften, Pressburg, Slowakische Republik.

1948 wurde der Erreger nach dem Arzt Burnet, der diesen als Rickettsie identifizierte, *Coxiella burnetii* DERRICK benannt (BENGSTON 1984).

Rickettsien sind intrazelluläre Parasiten und für Menschen und Tiere pathogen. So war das Fleckfieber, das von *Rickettsia prowazekii* verursacht wird, Jahrhunderte lang eine Geisel der Menschheit. Das Reservoir für diese Erreger bilden in erster Linie Kleinsäuger, während Arthropoden, vor allem Zecken, als Vektoren auftreten. Rickettsien sind für die meisten Vektoren apathogen. Eine Ausnahme bildet *R. prowazekii*, die für ihren Vektor, die Kleiderlaus (*Pediculus humanus humanus*), 100%-ig pathogen ist.

Rickettsien wurden irrtümlich lange Zeit zwischen Viren und Bakterien gestellt. Rickettsien gleichen aber mit Ausnahme von *C. burnetii*, welche gram-positiv oder gram-labil ist, den gram-negativen Bakterien. Typisch ist die Stäbchenform. Die dreischichtige Zellwand und die darunter liegende Plasmamembran zeigen das typische Bild einer Bakterienzelle.

Die Rickettsien (Ordnung Rickettsiales, Familie Rickettsiaceae) werden in zwei Gattungen unterteilt. Gattung *Rickettsia* DA ROCHA LIMA, 1916 mit drei Gruppen und 14 Arten und Gattung *Coxiella* PHILIP 1948 mit der einzigen Art *Coxiella burnetii* PHILIP 1948. Bei den einzelnen Arten bestehen zum Teil signifikante morphologische, chemische und große Unterschiede in ihrer Pathogenität.

C. burnetii ist sehr resistent gegen chemische Einflüsse. In trockener Wolle kann *C. burnetii* 1-9 Monate, in getrocknetem Blut bei Zimmertemperatur ≥ 183 Tage, in Magermilch 24 Monate und in Leitungswasser 3 Monate am Leben bleiben. Die Infektion mit *C. burnetii* erfolgt, zum Unterschied zu einer solchen mit anderen Rickettsien, in erster Linie aerogen. Die Zecken mit ihren Wirten, vor allem Kleinsäuger, bilden die Voraussetzung zur Erhaltung von Naturherden dieses Erregers.

C. burnetii ist ein äußerst infektiöses Agens. Schon 1 bis 2 Organismen können eine Infektion bei Mensch und Tier verursachen (ORMSBEE et al. 1978). Die Inkubationszeit beträgt 13 - 37 Tage. Die Erkrankung beginnt mit Fieber von 38 - 40,5° C, Kopf- und Gliederschmerzen. Verschiedene Komplikationen des respiratorischen Systems und des Nervensystems können auftreten. Die Erkrankung klingt meist nach ca. 9 Tagen ab. Bedeutend gefährlicher als die akute Form ist die chronische Form des Q-Fiebers, verursacht durch eine persistierende Infektion. Es kommt im Laufe der Entwicklung zu Komplikationen im kardiovaskulären System mit eventuell assoziierter Hepatitis. Monate oder Jahre nach der akuten Infektion entwickelt eine geringe Anzahl von Betroffenen eine bakterielle Endocarditis. Für die Behandlung werden vor allem Tetracycline angewandt.

Trotz der festgestellten häufigen Antikörper bei Menschen, Haus- und Wildtieren im Burgenland (SIXL et al. 1973) und in Tirol (KAASERER et al. 1976, KAASERER & REHACEK 1979, STÜNZNER et al. 1979), scheinen bisher wenige Erkrankungen aufgetreten oder diagnostiziert worden zu sein.

Im Rahmen von vorhergehenden serologischen Untersuchungen wurden in Nordtirol aus 115 Gemeinden 2337 Sera von Haustieren und 332 Sera von Wildtieren, sowie aus 19 Gemeinden 457 Humansera untersucht. Zecken aus 36 verschiedenen Fundorten wurden im Hämocytentest und im indirekten Immunfluoreszenz-Test (IIFT) auf eine Infektion mit Rickettsien getestet (KAASERER 1974).

Um diese früheren serologischen Untersuchungen zu ergänzen und damit eine Lücke in der Rickettsienforschung in Österreich zu schließen, wurde von uns versucht, *Coxiella burnetii* aus *Ixodes ricinus*-Zecken, die in Tirol gesammelt wurden, zu isolieren.

2. Material und Methode:

Das Aufsammeln der Zecken erfolgte vor allem im Raum Kitzbühel – Kufstein in einer Meereshöhe zwischen 500 und 1200 m in der Zeit von Mai bis September 1990. Das Sammeln der Zecken von der Vegetation geschieht am besten mittels einer dünnen Woldecke, die über die Vegetation gestreift wird. Die Zecken bleiben an

den Haaren hängen und können mit einer feinen Pinzette abgenommen und in Glasröhrchen übertragen werden.

Die Sammelgebiete in Nordtirol unterscheiden sich zum Teil wesentlich hinsichtlich der abiotischen Faktoren (Feuchtigkeit, Temperatur, Bodenbeschaffenheit) und der biotischen Faktoren (Anzahl der Wirtstiere). Allgemein kann gesagt werden, daß die Populationsdichte von *I. ricinus* in Tirol geringer ist als in anderen Gebieten Österreichs, der Schweiz oder der Slowakei, in denen *I. ricinus* vorkommt. Die Dichte der Besiedlung und der Verkehrswege, die geringere Anzahl von Kleinsäugetern und klimatische Faktoren scheinen dafür die Ursache zu sein (KAASERER 1974).

Günstige Fangplätze bildet die Vegetation entlang von Wildwechsellern, von Waldwegen und Waldrändern mit Buschwerk. Feuchte, schattige Lagen werden von allen Stadien bevorzugt. *I. ricinus* ist eine drei-wirtige Zecke. Larven und Nymphen saugen vor allem an Kleinsäugetern, aber auch an Reptilien und Vögeln. Adulte Zecken saugen an größeren Säugetieren, einschließlich dem Menschen. Die Rickettsien können zwischen den Zecken sowohl transstadial als auch transovarial übertragen werden. Damit bilden die Zecken ein zusätzliches Reservoir für Rickettsien.

Es wurden aus praktischen Gründen nur weibliche Zecken gesammelt. Im Hämocytentest (REHACEK et al. 1971) wurden die Zecken auf einen Befall mit Rickettsien untersucht. Dazu wird den Zecken der distale Teil eines Beines abgeschnitten und die daraus austretende Hämolymphe auf einen Objektträger gebracht und nach Gimenez gefärbt (GIMENEZ 1964). Im Lichtmikroskop erscheinen die so gefärbten Rickettsien rot. Positive Zecken wurden entweder einzeln oder in pools von 2 - 3 Individuen in salinen Suspensionen homogenisiert. Zur Isolation wurden die Suspensionen in die Dottersäcke von 6 bis 7 Tage alten embryonierten Hühnereiern inokuliert. Die isolierten Rickettsien-Stämme wurden zum Anlegen von Kulturen in halbangesaugten Zecken der Art *Dermacentor reticulatus*, die an gesunden Kaninchen gesaugt hatten, inokuliert. Zur taxonomischen Identifikation der isolierten Stämme wurden nachstehende Untersuchungsmethoden angewandt: Komplementbindungsreaktion (KBR), indirekter Immunfluoreszenz-Test (IIFT), der "enzym-linked immunosorbent assay" (ELISA), Sandwich Variante (KOVOCOVA et al. 1987), SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (LÄMMLI 1970) und Immuno-Blotting (Western Blot) (TOWBIN et al. 1979). Wie die Lipopolisaccharide (LPS)-Profile zeigen, gehören die beiden isolierten Stämme zu solchen, die akutes Q-Fieber verursachen.

3. Ergebnisse:

Von den 275 weiblichen *Ixodes ricinus*-Zecken, die im Hämocytentest untersucht wurden, waren 31, das sind 11,3 %, mit Rickettsien infiziert (Tab. 1). Daraus konnten zwei Stämme (4 und 8) von *Coxiella burnetii* isoliert werden (siehe Tabelle). Gleich wie bei dem Stamm Nine Mile von *C. burnetii*, dem Verursacher des akuten Q-Fiebers, zeigen die beiden isolierten österreichischen Stämme LPS-Profile (SDS-PAGE) mit den typischen Doppelbanden im Bereich von 14 - 16 ka.

Sie unterscheiden sich klar von den LPS-Profilen der anderen untersuchten Rickettsien-Stämme wie *R. prowazekii*, *R. conorii*, *R. slovaca* und *C. burnetii*, Stamm Priscilla, dem Verursacher des chronischen Q-Fiebers.

Tab. 1: Fundorte und Fangzahlen (n) der untersuchten Zecken aus dem Raum Kitzbühel - Kufstein (Tirol).

Fundort	Höhe (m ü.M.)	n	Hämocytentest		isolierte Stämme
			negativ	positiv	
Längsee b. Kufstein	700	8	7	1	1/Nr. 8
Stimmersee	550	2	1	1	
St. Adolari/Pillersee	850	14	13	1	
Haselbach b. Waidring	600	19	16	3	
Aufstieg Talsenalm	900	25	21	4	
Talsenalm b. Waidring	1000	18	16	2	
Aufstieg Waidring Hausberg	900	14	12	2	
Aufstieg Hausberg Waidring	1000 - 1100	84	77	7	
Hausberg	ca. 1200	68	60	8	1/Nr. 5
Straße Pillersee - Waidring	ca. 800	23	21	2	
		275	244	31 (= 11,3%)	

4. Diskussion:

Die Bedeutung der Ergebnisse ergibt sich aus der Erst-Isolation von *Coxiella burnetii* aus *Ixodes ricinus*-Zecken in Österreich und der Isolation eines Stammes (Nr. 5) aus Zecken, die von einem in über 1000 m Meereshöhe gelegenen Fundplatz stammen. Die Isolation von 2 Stämmen dieser Rickettsien bestätigt unsere früheren positiven serologischen Untersuchungsergebnisse bei Menschen, Haus- und Wildtieren sowie die Ergebnisse unserer früheren Zecken-Untersuchungen in Nordtirol.

Die Ergebnisse zeigen auch, wie dies schon früher in der Slowakei festgestellt wurde, daß es, trotz des Vorkommens des Erregers in der Natur (Zecken), zu keinem Ausbruch von Erkrankungen mit Q-Fieber kommen muß (REHACEK et al. 1991). Dies weist auf das Vorkommen und die Zirkulation von Erregern mit niedriger oder verminderter Virulenz hin.

Dieses interessante Faktum wurde nicht nur in Österreich, sondern auch in der Slowakei und in Deutschland (im Bayerischen Wald) festgestellt (REHACEK et al. 1993).

D a n k : Die Autoren bedanken sich für die Unterstützung durch die slovakische Akademie der Wissenschaften (Grant Nr. 2/999256).

5. Literatur:

- BENGSTON, I.A. (1948): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. — 6th ed. Baltimore, Williams a. Wilkins Company, 1092 pp.
- DERRICK, E.H. (1937): Med. J. Austr. 2, 281 pp.
- GIMENEZ, D.F. (1964): Staining in yolk sac cultures. — Stain Technology 30, Nr. 3.
- KAASERER, B. (1974): Rickettsien bei Wild- und Haustieren in Tirol. — Diss. Univ. Innsbruck, Institut für Zoologie, 116 pp.
- KAASERER, B., G. KAASERER, W. SIXL, & D. STÜNZNER (1976): Q-Fieber Untersuchungen in Tirol. — II. Intern. Arbeitskolloquium über "Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa", Graz, 25. - 28. Feb. 1976: 331 - 402.
- KAASERER, B., G. KAASERER, W. SIXL, H. WITHALM & D. STÜNZNER (1976): Serologische Untersuchungen von Wildtieren in der alpinen Region in Tirol. — Ibidem: 399 - 402.
- KAASERER, B. & J. REHACEK (1979): Serologische Untersuchungen über das Vorkommen von Antikörpern gegen Rickettsien der Spotted Fever Gruppe und *Coxiella burnetii* bei Humanseren in Tirol, Österreich. — III. Internationales Arbeitskolloquium über "Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa, Graz-Seggau: 24 - 27. Mai 1979: ????
- KOVACOVA, E., J. GALLO, S. SCHRAMEK, J. KAZAR & R. BREZINA (1987): *Coxiella burnetii* antigens for detection of Q-Fever antibodies by ELISA in human sera. — Acta virol. 31: 254 -259.
- LAEMMLI, U.K. (1970): Clearance of structural Protein during the assembly of the head of bacteriophage T 4. — Nature 227: 680 - 685.
- ORMSBEE, R.A., M.G. PEACOCK? R. GERLOF (1978): Inf. Immunol. 19: 239.
- REHACEK, J., R. BREZINA, E. KOVACOVA & M. ZUPANCICOVA (1971): Haemocyte test an easy, quick and reliable Method for the detection of Rickettsiae in ticks. — Acta vir. 15: 237 - 240.
- REHACEK, J., J. URVÖLGY, Z. KOCIANOWA, M. SEKEYOVA, M. VAVREKOVA & E. KOVACOVA (1991): Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. — Eur. J. Expidemiol. 7: 299 - 303.
- REHACEK, J., H. KRAUSS, E. KOCIANOVA, E. KOVACOVA, G. HINTERBERGER, P. HANNAK & V. TUMA (1993): Studies of the prevalence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q-fever, in the foothills of the southern Bavarian forest, Germany. — ZBL. Bakt. 278: 132 - 138.
- SIXL, W., J. URVÖLGY, D. STÜNZNER, J. REHACEK, M. ZUPANCICOVA, R. BREZINA & E. KOVACOVA (1973): Rickettsien in Österreich. Untersuchungen bei Wildtieren, Haustieren und Zecken. — I. Intern. Arbeitkolloquium über "Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa", Illmitz: 80 - 86.
- SIXL, W., J. URVÖLGY, H. WITHALM, R. BREZINA, D. STÜNZNER, J. REHACEK & W. THIEL (1973): Ibidem: 87 / 89.

- STÜNZNER, D., J. REHACEK, B. KAASERER, J. URVÓLGY, G. KAASERER, H. TROGER & I. TATASEVICH (1980): Untersuchungen über Rickettsiosen in Nordtirol. – III. Intern. Arbeitskolloquium über Naturherde von Infektionskrankheiten in Zentraleuropa, Graz-Seggau: 24. - 27. Mai 1979.
- TOWBIN, H., T. STAEBELIN & J. GORDON (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. – Proc. Natl. Acad. Sci 76: 4350 - 4354.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte des naturwissenschaftlichen-medizinischen Verein Innsbruck](#)

Jahr/Year: 1994

Band/Volume: [81](#)

Autor(en)/Author(s): Kaaserer B., Rehacek J., Urvögly J., Kovacova E., Lukacova M., Kocianova E.

Artikel/Article: [Erst-Isolation des Q-Fieber Erregers Coxiella burnietii aus Ixodes ricinus Zecken in Tirol \(Österreich\) \(Ixodides\). 223-227](#)