

Lyme-Borreliose: Erregersuche in Zecken aus der Region um Manaus (Brasilien)

A. Sauter¹, H. Eiffert², W. Bommer¹

Einleitung Die Lyme-Borreliose ist eine multisystemische Infektionskrankheit. Der Erreger dieser Anthropozoonose, *Borrelia burgdorferi*, wird durch Schildzecken übertragen. In Europa und Nordamerika, wo für die Übertragung auf den Menschen in erster Linie Zeckenarten der Gattung *Ixodes* verantwortlich gemacht werden, gehört die Krankheit zu den häufigsten vektorieell bedingten Infektionskrankheiten. Lyme-Borreliose wurde u. a. in Japan, China, der ehemaligen Sowjetunion, Süd-Ost-Asien sowie Südafrika beschrieben (3).

Auch in Brasilien gibt es Hinweise auf das Vorkommen der Krankheit: Fallberichte mit den für Lyme-Borreliose typischen Symptomen und der Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* lassen dort eine Verbreitung von *Borrelia burgdorferi* vermuten (4). In vorangegangenen Untersuchungen waren auch in Manaus Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* in Patientenblut entdeckt worden (5). Bisher wurde in Brasilien aber noch kein Nachweis humanpathogener Stämme von *Borrelia burgdorferi* erbracht.

Ziel der dem vorliegenden Beitrag zugrundeliegenden Studie war es, ein mögliches Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* in Manaus (Brasilien) und umliegenden Regionen zu untersuchen. Verschiedene Nachweisverfahren (PCR, IFT, Erregeranzucht) wurden eingesetzt, um das Bakterium in brasilianischen Zecken und in Gewebeproben nachzuweisen.

Material und Methoden Schildzecken (Ixodidae) wurden in Manaus und Umgebung in einem Umkreis von bis zu 300 km um die Stadt gesammelt. Für die Auswahl der Gebiete für die Zeckensuche wurden Patienten, die sich in der dermatologischen Abteilung des Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMTM) mit Erythema migrans-ähnlichen Hauterscheinungen vorgestellt hatten, über einen möglichen Kontakt mit Zecken befragt. Um Zecken (Larven, Nymphen und adulte Zecken) in ihrem natürlichen Lebensraum zu sammeln, wurden Flanelltücher über die bodennahe Vegetation gestreift („Flagging“). Zecken wurden von Wirtstieren entfernt und mit Hilfe der CO²-Sammeltechnik unter

Verwendung von Trockeneis gesammelt (6). Die Bestimmung der Zecken erfolgte unter dem Binokular sowie lichtmikroskopisch, für Rücksprache und Kontrolle über die durchgeführten Klassifikationen stellte sich R. PETNEY am Hygieneinstitut in Heidelberg freundlicherweise zur Verfügung. Die für diese Studie untersuchten Hautbiopsien stammen von Erythema migrans-ähnlichen Hauterscheinungen von drei Patienten des IMTM.

Für einen Nachweis von Borrelieninfektionen wurden Zecken mit PCR und indirekten Immunfluoreszenztests (IFT) untersucht. Beim indirekten IFT wurden polyvalente Immunsereen K37 und K17 von Kaninchen eingesetzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. WILSKE, Pettenkofer Institut der Universität München). Diese enthielten monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenproteine A und C (OspA und OspC) von *Borrelia burgdorferi* (7). Um Antigen-Antikörper-Komplexe fluoreszenzmikroskopisch nachzuweisen, wurde FITC (Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertes) Immunglobulin vom Schwein gegen Kaninchen verwendet. Für eine Untersuchung mit der PCR (Polymerasekettenreaktion) mußte DNA durch Phenolchloroformextraktion aus Zecken und Hautbiopsien isoliert werden. OspA-spezifische Primer und Primer für das Flagellin-Gen (Fla) wurden für die Amplifizierung der Ziel-DNA eingesetzt. Zur Erhöhung von Sensitivität und Spezifität wurde über eine erste Zyklenfolge hinausgehend eine konsekutive zweite PCR-Runde durchgeführt („nested PCR“). Teilweise wurden mehrere Zecken für die DNA-Aufarbeitung und anschließende PCR-Untersuchung „gepooled“. Zur Anzucht von *Borrelia burgdorferi* wurde ein modifiziertes, mit Cotrimoxazol versetztes Medium nach KELLY verwendet. Kulturen wurden bei 37°C drei Monate lang inkubiert, regelmäßig kontrolliert und gegebenenfalls mittels Sterilfiltration gereinigt.

Ergebnisse Von September 1995 bis Februar 1996 wurden in der Region um Manaus 1070 Zecken aller drei Entwicklungsstadien für die Borrelienuntersuchung gesammelt (Tab. 1). Darunter befanden sich 11 klassifizierte Ixodidae-Spezies, außerdem Larven und Nymphen verschiedener Amblyomma-Spezies, die nicht klassifiziert werden konnten. Zu den gesammelten Spezies gehörten *Amblyomma crassum*, *A. geayi*, *A. incisum*, *A. naponense*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. pecarum*, *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus* und *Rhipicephalus sanguineus*. Durch Flagging wurden vor allem Amblyomma-Spezies (sämtliche Stadien) gesammelt. Mit der CO²-Sammeltechnik konnten zahlreiche Larven einer nicht näher klassifizierten Amblyomma-Spezies gesammelt werden. Bei der Untersuchung von Vertebraten konnte *Rhipicephalus sanguineus* an Hunden, *Boophilus microplus* vor allem an Rindern, *Anocentor nitens* an Pferden und *Amblyomma crassum* an Geomyda-Spezies (Landschildkröten) gefunden werden.

Bei den mit polyvalenten Kaninchenseren durchgeführten Immunfluoreszenztests (Tab. 2) konnten an 253 in Brasilien gesammelten Zecken keine Borrelien nachgewiesen werden. Zum Vergleich im Juli 1995 in Göttingen gesammelte Zecken, *Ixodes ricinus*, waren zu 33% (8 von 24 Zecken) IFT-positiv (Nymphen 2/3, weibliche Adulte 3/10, männliche Adulte 3/11). Die durchgeführten Tests wurden als positiv gewertet, wenn unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung mindestens drei borrelienähnliche Objekte entdeckt werden konnten.

Borrelien-DNA konnte in den durchgeführten Untersuchungen mit der PCR an brasilianischen Zecken nicht amplifiziert werden. 531 Zecken wurden mit der OspA-PCR untersucht. 265 dieser Zecken wurden zusätzlich mit der Fla-PCR getestet (Tab. 3). *Borrelia burgdorferi*-DNA vom Stamm Gö2 wurde als Positivkontrolle in die DNA-Aufarbeitung und direkt in die PCR eingesetzt. Bei in Göttingen gesammelten Zecken, *Ixodes ricinus*, die mit OspA- und Fla-PCR untersucht wurden, waren 32% (5/16) in beiden PCR-Untersuchungen positiv (Nymphen 0/2, weibliche Adulte 1/6, männliche Adulte 4/8).

Drei Hautbiopsien aus Erythema-migrans-ähnlichen Hauterscheinungen von Patienten des IMTM wurden auf eine mögliche Borrelieninfektion mit OspA- und Fla-PCR untersucht. Während mehrmaliger Wiederholung von DNA-Aufarbeitung und PCR wurde in keiner der untersuchten Biopsien Borrelien-DNA nachgewiesen.

Tabelle 1:
Gesamtzahl der in der Region um Manaus gesammelte Zecken (Sept. 1995 - Feb. 1996).

Spezies	Larven	Nymphen	weiblich	männlich	total
<i>Amblyomma crassum</i>			8	14	22
<i>A. geayi</i>			6	1	7
<i>A. incisum</i>			1	5	6
<i>A. naponense</i>				7	7
<i>A. oblongogutatum</i>			2	1	3
<i>A. ovale</i>			4	4	8
<i>A. parvum</i>			2		2
<i>A. pecarium</i>			5	3	8
<i>A. spp.</i>	434	53			487
<i>Anocentor nitens</i>	11	60	21	19	111
<i>Boophilus microplus</i>	177	3	71	36	287
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		13	58	51	122
Total	622	129	178	141	1070

Tabelle 2:
Mit Indirektem Immunfluoreszenstest untersuchte Zecken.

Spezies	Larven	Nymphen	weiblich	männlich	total
<i>Amblyomma crassum</i>				3	3
<i>A. geayi</i>			2	1	3
<i>A. incisum</i>			1	2	3
<i>A. naponense</i>				2	2
<i>A. oblongogutatum</i>			1	1	2
<i>A. ovale</i>			1	2	3
<i>A. parvum</i>			2		2
<i>A. pecarium</i>			2	2	4
<i>A. spp.</i>	55	19			74
<i>Anocentor nitens</i>		17	11	8	36
<i>Boophilus microplus</i>	25	1	42		68
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		8	25	20	53
Total	80	45	87	41	253

Tabelle 3:
Mit der OspA-PCR und Fla-PCR (in Klammern) untersuchte Zecken.

Spezies	Larven	Nymphen	weiblich	männlich	total
<i>Amblyomma crassum</i>			2 (1)	6 (5)	8 (6)
<i>A. geayi</i>			4 (4)		4 (4)
<i>A. incisum</i>				3 (3)	3 (3)
<i>A. naponense</i>				5 (3)	5 (3)
<i>A. oblongogutatum</i>			1 (1)		1 (1)
<i>A. ovale</i>			3 (3)	2 (2)	5 (5)
<i>A. pecarium</i>			3 (3)	1 (1)	4 (4)
<i>A. spp.</i>	196 (108)	34 (30)			230 (138)
<i>Anocentor nitens</i>	2 (2)	42 (24)	4 (3)	9 (9)	57 (38)
<i>Boophilus microplus</i>	127 (10)	2	13 (10)	24 (21)	166 (41)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		5 (2)	21 (12)	22 (8)	48 (22)
Total	325 (120)	83 (56)	51 (37)	72 (52)	531 (265)

Während der Versuche einer Bakterienan-zucht konnten keine Borrelien aus den brasi-lianischen Zecken angezüchtet werden. Zu den insgesamt 8 Zecken, die in Göttingen und im Pettenkofer Institut in München zur Borre-lienanzucht verwendet wurden, gehörten *A. pecarium*, *A. ovale*, *A. incisum*, vier *R. sangui-neus* (adulte Stadien), sowie eine nicht klassi-fizierte *Amblyomma*-Spezies (Nymphen-stadium).

Diskussion

Beschreibungen von Borreliose-ähnlichen Symptomen, sowie serologische Untersu-chungen lassen eine Verbreitung von Lyme-Borreliose in Brasilien vermuten. Der Erreger der Krankheit konnte bisher allerdings dort nicht nachgewiesen werden. Auch in den für diese Studie untersuchten Zecken, die als mögliche Vektoren für *Borrelia burgdorferi* angesehen wurden, konnte kein Nachweis für das Bakterium erbracht werden. PCR-Untersu-chungen von drei Hautbiopsien fielen eben-falls negativ aus.

Bei den durchgeführten PCR-Untersuchun-gen hatten die verwendeten Primer für das OspA-Gen eine hohe Sensitivität und Spezi-fität für *B. burgdorferi sensu lato*. Der Primer für das Fla-Gen wurde danach ausgewählt, mög-lichst viele Borrelienspezies zu erkennen. Es ist möglich, dass die eingesetzten Primer für in Brasilien vorkommende Borrelien nicht geeig-net sind. Auch die für IIFT eingesetzten poly-valenten Immunseren K37 und K17 gegen OspA und OspC sind möglicherweise nicht in der Lage, an Antigenstrukturen brasilianischer Borrelien zu binden. Die *Borrelia-burgdorferi*-spezifischen Proteine mit bekannten hetero-genen Strukturen in Europa und Nord Amerika könnten bei südamerikanischen Borrelien grundlegende Unterschiede aufweisen.

Alle untersuchten Zecken gehörten der Ixo-didae-Familie (Schildzecken) an. Die in der Region Manaus vorkommenden und gesam-melten Zecken gehörten jedoch nicht zum *Ixodes persulcatus/ricinus*-Komplex, der in der nördlichen Hemisphäre vor allem für Bor-relieninfektionen des Menschen verantwor-tlich gemacht wird. Mehr als 45 Ixodides-Arten wurden in Brasilien beschrieben (9). Die

Untersuchung umfaßt also nur einen begrenzten Teil der brasilianischen Fauna. Für den ausgebliebenen Nachweis von Borrelien kann eine zu geringe Prävalenz der Bakterien in den Zecken oder entsprechend eine zu geringe Anzahl an untersuchter Zecken verantwortlich sein. Ob möglicherweise auch andere blutsaugende Insekten eine Bedeutung für die Übertragung einer Borreliose in Brasilien zukommt, muß noch untersucht werden.

Klinische Beschreibungen von Symptomen, die auf eine Infektion mit *Borrelia burgdorferi* hinweisen, müssen kritisch geprüft werden. Differentialdiagnostisch müssen beim Erythema migrans z. B. Erysipel, Phlegmone, Insektenstiche und allergische Reaktionen in Betracht gezogen werden. Positive serologische Nachweise durch ELISA oder Westernblot müssen hinsichtlich ihrer Spezifität und einem Auftreten von falsch positiven Ergebnissen geprüft werden. Kreuzreaktionen können durch Infektionen mit anderen Spirochäten und Bakterien hervorgerufen werden. Falsch positive Reaktionen treten auch bei rheumatischen Krankheiten oder durch unspezifische kreuzreaktive Antikörper auf (10).

Vielleicht werden weitere und umfassendere Untersuchungen in Brasilien zu einem Erregernachweis in Zecken oder am Patienten führen. Bis dahin bleibt ungeklärt, ob humanpatogene Spirochäten für das Auftreten einer Lyme-Borreliose in Brasilien verantwortlich sind.

Zusammenfassung In Brasilien gibt es klinische und serologische Hinweise auf das Vorkommen einer Lyme-Borreliose. Es wurde versucht *Borrelia burgdorferi* in brasilianischen Zecken nachzuweisen. Von September 1995 bis Februar 1996 wurden in Manaus und umliegenden Regionen 792 Schildzecken (Ixodidae) gesammelt. Um eine mögliche Borrelieninfektion nachzuweisen wurden PCR und Indirekte Immunfluoreszenztests eingesetzt sowie Versuche einer Borrelienanzucht unternommen. Außerdem wurden drei Biopsien von Erythema migrans-ähnlichen Hauterscheinungen nach Borrelien untersucht. Ein durch Zecken übertragener Erreger, der für das Auftreten einer Lyme-Borreliose in Brasilien verantwortlich ist, konnte bisher nicht entdeckt werden.

Schlüsselwörter *Borrelia burgdorferi*, Ixodidae, Brasilien.

Summary *Lyme borreliosis: a search for the causative agent in ticks from the region around Manaus Brasil*

There are clinical and serological references to an occurrence of Lyme borreliosis in Brasil. Attempts were made to isolate *Borrelia burgdorferi* from Brazilian ticks. 792 hard ticks were collected from September 1995 to February 1996 in Manaus and the surrounding environment. The detection of possible infections with borreliae was performed by PCR, indirect immuno-fluorescence assay and inoculation in culture media. In addition Erythema-migrans-like skin lesions were tested. The existence of a bacterium transmitted by ticks and causing Lyme disease in Brasil could not be proved yet.

Key words *Borrelia burgdorferi*, Ixodidae, Brasil.

Danksagung Für die Zusammenarbeit und Unterstützung bei dieser Arbeit sind wir dem Instituto de Medicina Tropical de Manaus dankbar verbunden. Besonderer Dank gilt Dr. Sinesio Talhari (dermatologische Abteilung) und Nelson Ferreira Fe (Entomologie).

Literatur

3. SIGAL L. H. (1988):
Lyme disease: a world-wide borreliosis.
Clin. Exp. Rheumatol. 6, 411-421.
4. YOSHINARI, N. H. (1997):
Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil
Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo 52(2), 111-117.
5. KÜHNE, G (1993):
Borrelia burgdorferi-Antikörperprävalenz in Brasilien
Mitt. Österr. Ges. Tropenmed. Parasitol. 15, 135-140.
6. GROTHAUS, R. H. et al. (1976):
A simplified carbon dioxide collection technique for the recovery of live ticks.
J. Med. Entomol 6, 702.
7. WILSKÉ, B. et al. (1996):
Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of Borrelia sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany.
Med. Microbiol. Immunol. 184, 195-201.
8. EIFFERT, H. et al. (1995):
Nondifferentiation between Lyme disease spirochetes from vector ticks and human cerebrospinal fluid.
J. Infect. Dis. 171, 476-479.
9. ARAGÃO, HB (1936):
Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes.
Mem Inst Oswaldo Cruz 31, 759-845.
10. BERG, D. et al (1991):
The Laboratory Diagnosis of Lyme Disease.
Arch. Dermatol. 127, 866-870.

Korrespondenzadresse Prof. Dr. W. Bommer
Tropenmedizinisches Beratungszentrum
W. v. Siemensstraße 10
D-37077 Göttingen · Deutschland

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1999

Band/Volume: [21](#)

Autor(en)/Author(s): Sauter A., Eiffert H., Bommer Wolfgang

Artikel/Article: [Lyme-Borreliose: Erregersuche in Zecken aus der Region um Manaus \(Brasilien\). 39-44](#)