

Aus dem Institut für Virologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Molekulare und immunologische Untersuchungen bei Tsutsugamushifieber in Nepal

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Nora En-Nosse

aus Gießen

Marburg 2022

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.06.2022

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: PD Dr. med. Christian Keller

1. Korreferent: PD Dr. med Christian Bauer

Widmung

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse	1
Abkürzungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	4
1. Einleitung	5
1.1. <i>Orientia tsutsugamushi</i>	5
1.2. Erregerreservoir und Vektor	8
1.2.1. Habitat	10
1.2.2. Infektionsweg und Risikofaktoren	10
1.3. Tsutsugamushifieber	11
1.3.1. Epidemiologie	12
1.3.2. Tsutsugamushifieber in Nepal	14
1.3.3. Pathophysiologie und Immunpathogenese	17
1.3.4. Klinik	21
1.3.5. Differentialdiagnosen und Schweres Fieber mit Thrombozytopenie- Syndrom (SFTS)-Virus-Infektion	23
1.3.6. Diagnostik	24
1.3.7. Therapie	28
1.3.8. Prävention	30
1.4. Fragestellung	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Charakteristik der Studiengruppen	33
2.1.1. Erhebung klinischer Daten und Risikofaktoren	35
2.1.2. Statistische Auswertung	35
2.2. Indirekte Immunfluoreszenz	36
2.2.1. Objektträger	36
2.2.2. Indirekter Immunfluoreszenz Antikörper Test	37
2.2.3. Sekundärantikörper	38
2.3. Nachweis von <i>O. tsutsugamushi</i> mittels PCR	39
2.3.1. Isolierung der Gesamt-Nukleinsäure	39
2.3.2. Nachweis von <i>O. tsutsugamushi</i> : 16S qPCR.....	39
2.3.3. Nachweis von <i>O. tsutsugamushi</i> : 47kD qPCR.....	42
2.3.4. Nachweis von <i>O. tsutsugamushi</i> : 56kD PCR.....	43
2.3.5. Nachweis von SFTS-Virus: RT qPCR.....	44
2.3.6. Primer und Sonden.....	45
2.3.7. Agarose-Gelelektrophorese	47
2.3.8. Sequenzierung nach Sanger	47

2.4.	Messung von Zytokinkonzentrationen mittels Multiplex-Immunoassay	48
3.	Ergebnisse	50
3.1.	Prävalenz <i>Orientia</i> -spezifischer Antikörper bei nepalesischen Patient:innen mit Tsutsugamushifieber	50
3.1.1.	<i>Orientia</i> -spezifisches IgM bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen	50
3.1.2.	<i>Orientia</i> -spezifisches IgG bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen	53
3.2.	Nachweis <i>Orientia</i> -spezifischer 16S DNA bei Patient:innen und Blutspender:innen	55
3.2.1.	Analytische Sensitivität der <i>Orientia</i> 16S spezifischen rt qPCR....	55
3.2.2.	Nachweis von <i>Orientia</i> 16S DNA in Seren von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen	56
3.2.3.	Ausschluss einer Infektion mit dem SFTS-Virus	60
3.3.	Nachweis des <i>Orientia</i> -spezifischen 47kD Gens in nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen	60
3.4.	Typisierung von <i>O. tsutsugamushi</i> mittels partieller Sequenzierung des 56kD Gens	61
3.5.	Klinische Präsentation der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen	64
3.6.	Charakterisierung der systemischen Zytokinantwort bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	67
4.	Diskussion	72
4.1.	Seroprävalenz von <i>Orientia</i> -spezifischen Antikörpern in Nepal	72
4.1.1.	IgM-Serostatus bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen	72
4.1.2.	IgG-Seroprävalenz in der nepalesischen Bevölkerung	75
4.2.	<i>Orientia</i> -spezifische 16S und 47kD DNA Nachweise in der nepalesischen Population	77
4.2.1.	Persistenz von <i>Orientia</i> -spezifischer DNA im Organismus	81
4.2.2.	Differentialdiagnostischer Ausschluss einer SFTS-Virus-Infektion	84
4.3.	Diversität von <i>O. tsutsugamushi</i> in Nepal	86
4.4.	Klinische Charakteristik von nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen	90
4.5.	Inflammatorische Immunantwort von nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen	93
4.6.	Schlussfolgerung	95
5.	Zusammenfassung	97

6. Summary	99
7. Literaturverzeichnis.....	101
8. Anhang	127
Verzeichnis der akademischen Lehrenden	127
Danksagung.....	128

Verzeichnisse

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AS	Aminosäuresequenz
AZ.	Aktenzeichen
β	Beta
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
bp	Basenpaare
BSL	Biosafety Level
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
Ct	Crossing threshold
Cy	Cyanin
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DZIF	Deutsches Zentrum für Infektionsforschung
EDCD	Epidemiology and Disease Control Division
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetacid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAM	Carboxyfluorescein
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
for	forward
γ	Gamma
°	Grad
h	Stunde
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFAT	Indirekter Immunfluoreszenz Antikörper Test
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IQR	Interquartile Range
kD	Kilodalton

KRIBS	Kathmandu Research Institute for Biological Sciences
M	Mol
mM	Millimol
μ	Mikro-
min	Minute
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n	Nano-
no.	number
n.z.	nicht zutreffend
O.	Orientia
OT	Orientia tsutsugamushi
PBS	Phosphate-buffered Saline
qPCR	Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RDT	Rapid Diagnostic Test
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseP	Ribonuklease P
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
rt	real time
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Svedberg
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
SFTS	Schweres Fieber mit Thrombozytopenie Syndrom
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
TSA	Typ spezifisches Antigen
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
VD	variable Domäne
z.B.	zum Beispiel
(-)	negativ
(+)	positiv
>	größer
≥	größer gleich
<	kleiner
≤	kleiner gleich

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Orte der Probensammlung in Nepal.....	33
Tab. 2: Studiengruppen.....	34
Tab. 3: Charakteristika der Sekundärantikörper.....	38
Tab. 4: Temperaturprofil der 16S qPCR (Sonthayanon et al. 2009).....	40
Tab. 5: Temperaturprofil der 47kD qPCR (Jiang et al. 2004).....	42
Tab. 6: Temperaturprofil der 56kD PCR (Mahajan et al. 2006).....	44
Tab. 7: Temperaturprofil der SFTS qPCR (Yoshikawa et al. 2014).....	45
Tab. 8: Übersicht der verwendeten Primer und Sonden.....	46
Tab. 9: Bestimmung der analytischen Sensitivität mittels Probit-Analyse.....	56
Tab. 10: 16S qPCR und <i>Orientia</i> -spezifischer IgM-Antikörpernachweis bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen.....	57
Tab. 11: Verteilung der sequenzierten Seren auf die 2 Orte der Probensammlung in Nepal.....	62
Tab. 12: Klinische Charakteristika der Patient:innen mit Tsutsugamushifieber und 16S qPCR Ergebnissen.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>O. tsutsugamushi</i>	5
Abb. 2: Schematische Abbildung des Lebenszyklus der <i>Trombicula akamushi</i> Milbe	9
Abb. 3: Nepal im Endemiegebiet des Tsutsugamushifiebers in Südostasien ...	14
Abb. 4: Foto eines Eschars von einem Tsutsugamushifieber-Patienten in Nepal	22
Abb. 5: Karte Nepals mit den Orten der Probensammlung	34
Abb. 6: Amplifikationskurven des <i>Orientia</i> 16S Standards und Standardkurve	41
Abb. 7: Primerbindungsstellen der 56kD PCR	43
Abb. 8: Prinzip des Immunoassays zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen	49
Abb. 9: Fließschema der IFAT für <i>Orientia</i> -spezifische IgM-Antikörper-Nachweise	51
Abb. 10: <i>Orientia</i> -spezifisches IgM bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen	51
Abb. 11: Normalisierte Häufigkeitsverteilung der <i>Orientia</i> -spezifischen IgM-Titer	52
Abb. 12: Indirekte Immunfluoreszenz (<i>Orientia</i> Karp IgG)	53
Abb. 13: <i>Orientia</i> -spezifisches IgG bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	54
Abb. 14: Normalisierte Häufigkeitsverteilung der <i>Orientia</i> -spezifischen IgG-Titer	54
Abb. 15: Konzentration von <i>Orientia</i> -DNA (16S Kopien/ ml) im Serum	58
Abb. 16: 16S-Amplifikate bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	59
Abb. 17: 16S Sequenzen aus dem Serum sechs nepalesischer Blutspender:innen	59
Abb. 18: 47kD Membranproteingen Nachweis durch <i>Orientia</i> -spezifische 47kD rt qPCR	60
Abb. 19: 56kD Amplifikate bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	61
Abb. 20: Phylogenetischer Stammbaum der partiellen 56kD Sequenzen aus nepalesischen Patient:innen mit Tsutsugamushifieber	63
Abb. 21: IL-6 im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	68
Abb. 22: IL-10 im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	69
Abb. 23: IFN- γ im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	70
Abb. 24: TNF- α im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen	71

1. Einleitung

1.1. *Orientia tsutsugamushi*

Orientia (O.) tsutsugamushi, aus dem Japanischen 恙 *tsutsuga* für Krankheit und 虫 *mushi* für Insekt, ist ein Gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium (Abb. 1), das verantwortlich für die im asiatischen Raum endemische Erkrankung namens Tsutsugamushifieber ist (Tamura et al. 1995). Erste Hinweise gibt es bereits aus dem 3. Jahrhundert in China (Fan et al. 1987), die erste Dokumentation in der medizinischen Fachliteratur stammt aus dem Jahre 1879 (Nagayo et al. 1917). Früher als *Rickettsia orientalis* oder *Rickettsia tsutsugamushi* klassifiziert, wird das Bakterium seit 1995 in der neuen Gattung namens *Orientia* mit der Spezies *Orientia tsutsugamushi* geführt (Tamura et al. 1995). Grund dafür sind phäno- und genotypische Unterschiede zwischen diesem Mikroorganismus und der Gattung *Rickettsia*.

O. tsutsugamushi ist ein kurzes Stäbchen mit einem Durchmesser von 0,5-0,8 μm und einer Länge von 1,2-3,0 μm (Tamura et al. 1995). Es besitzt eine Hülle mit weicher Zellwand und Membran, deren äußeres Blatt dicker als das innere Blatt ist. Peptidoglykane und Lipopolysaccharide fehlen (Amano et al. 1987). Die Anfärbung ist mittels Giemsa-Färbung möglich (Tamura et al. 1995).

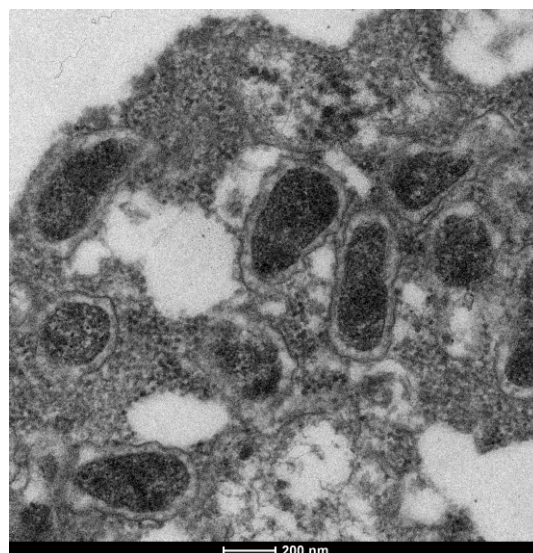


Abb. 1: Transmissions-Elektronenmikroskopische Aufnahme von *O. tsutsugamushi* L929 Zellen an Tag 7 nach Infektion. Zur Verfügung gestellt von Christel Schmetz/ Christian Keller.

Das Genom von *O. tsutsugamushi* ist als einzelnes zirkuläres Chromosom im Median sequenziert 2,1 Millionen Basenpaare (bp) groß und hat damit das größte Genom der Ordnung *Rickettsiales*. Mittlerweile liegen für weniger als zehn *Orientia*-Stämme vollständig sequenzierte Genome vor, z.B. von den Stämmen Boryong oder Ikeda (Cho et al. 2007; Nakayama et al. 2008). Obwohl eine hohe genetische Diversität beschrieben ist, existieren auch konservierte Gene, darunter proteinkodierende Gene und ribosomale Sequenzen. Das 16S ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) Gen mit mehr als 98,5% Homologie zwischen den Stämmen und das 47 Kilodalton (kD) Gen mit ca. 96,4% Homologie (Jiang et al. 2013) beispielsweise sind dadurch für molekulare Nachweise des Bakteriums geeignet (Enatsu et al. 1999; Ohashi et al. 1995). Auch lässt sich *O. tsutsugamushi* durch seine 16S rRNA Sequenzen von den *Rickettsiae* abgrenzen, da diese in der phylogenetischen Analyse nicht miteinander clustern (Tamura et al. 1995).

Das *O. tsutsugamushi* Genom besitzt darüber hinaus eine im Vergleich zu anderen Bakterien ausgesprochen große Zahl an proteinkodierenden Genen (Cho et al. 2007; Nakayama et al. 2008). Dazu gehören u.a. die Gene der Membranproteine, sogenannte Typ-spezifische Antigene (TSA): 22kD, 47kD, 56kD und 110kD Proteine (Tamura et al. 1995). Die Gene dieser Proteine können ebenfalls für einen Nachweis von *O. tsutsugamushi* herangezogen werden. Weiterhin besitzt der Organismus eine hohe Zahl (200-fach) an repetitiven Sequenzen insbesondere im Vergleich zu anderen Bakteriengenomen (Cho et al. 2007; Nakayama et al. 2008). Die Durchmischung der repetitiven Elemente innerhalb des *O. tsutsugamushi* Genoms, häufige Punktmutationen in kodierenden Genen sowie die hohe Rate an genetischer Rekombination tragen zu einer großen Diversifizierung der Bakterienstämme bei (Vincent 2016; Phetsouvanh et al. 2015; Kim et al. 2017; Sonthayanon et al. 2010).

Durch die hohe genetische Diversität der proteinkodierenden Gene kommt die große Antigen Diversität von *O. tsutsugamushi* zustande. Diese ist hauptsächlich zurückzuführen auf die Variabilität des 56kD TSA-Proteins der äußeren Membran (Tamura et al. 1995; Tamura et al. 1985), welches spezifisch für *O. tsutsugamushi* ist (Kelly et al. 2009). Innerhalb des 56kD TSA Gens existieren Regionen mit besonders großen Unterschieden (Ähnlichkeit <50% - >75%

zwischen den Stämmen) die sogenannten variablen Domänen (VD) I, II, III, IV (Tamura et al. 1995; Ohashi et al. 1992b). Diese sind in den hydrophilen Regionen des Moleküls lokalisiert und liegen zwischen Aminosäureposition 100 und 500 des offenen Leserahmens (*open reading frame*). Die VD I liegt bei den Stämmen Karp, Gilliam, Kato, Kawasaki und Kuroki zwischen den Aminosäurepositionen 105-133 (entspricht 315-399 bp) und enthält 22-28 Aminosäuren. Die VD II ist nahezu einzigartig in jedem 56kD TSA Protein, die VD III weist große Ähnlichkeiten zwischen den Stämmen auf und die VD IV stellt die größte variable Domäne dar (Ohashi et al. 1992b). Mittels Gensequenzierung des 56kD TSA Gens können die verschiedenen *O. tsutsugamushi* Stämme unterschieden und klassifiziert werden (Ohashi et al. 1992b; Kelly et al. 2009). Unabhängig von der Typisierungsmethode ist es schwierig einen bestimmten Sequenztyp einem genauen geographischen Ort zuzuordnen (Enatsu et al. 1999; Kelly et al. 2009). In manchen Gebieten existieren genetische Typen, die eine höhere Prävalenz als andere aufweisen (Ogawa und Ono 2008) und ggf. verknüpft mit dem Vorkommen einer bestimmten Vektorspezies sind. Karp ist mit einem Anteil von 40-50% der häufigste vorkommende Stamm (Kelly et al. 2009).

Das 56kD Membranprotein ist ein hitzelabiles immundominantes Antigen mit alternierenden hydrophoben und hydrophilen Regionen und besitzt eine Größe von 516-541 Aminosäuren (Ohashi et al. 1992b; Kelly et al. 2009). Zu Beginn der 1960er Jahre wurden drei Serotypen definiert: Karp, Kato und Gilliam (Shishido 1964). Mittlerweile sind es mit mindestens 20 deutlich mehr (Ohashi et al. 1992b; Ohashi et al. 1996; Kelly et al. 2009). Das 56kD Antigen ist immundominant, da im Menschen wie auch in anderen Säugetieren hauptsächlich gegen dieses Antikörper gebildet werden. Dabei lässt sich auch eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen einen Serotyp mit dem Antigen eines anderen Stammes verzeichnen, daher ist es enorm wichtig, dass verschiedene Antigene in der serologischen Diagnostik berücksichtigt werden (Vincent 2016; Ohashi et al. 1992b).

Es gibt Hinweise darauf, dass die 56kD TSA Diversität für die unterschiedliche Virulenz der einzelnen Stämme verantwortlich ist (Tamura et al. 1995; Bengtson 1945). Das 56kD TSA Protein spielt nämlich auch bei der Zellinvasion eine Rolle. Es vermittelt die Adhäsion und den Eintritt in die Zelle, zum Teil auch

über Phagozytose (Tamura et al. 1995; Díaz et al. 2018). Integrine und Clathrine sind intrazellulär am Invasionsmechanismus beteiligt (Díaz et al. 2018; Vincent 2016; Chu et al. 2006). Nach ca. 2 h verlässt *O. tsutsugamushi* pH-bedingt das Phagosom und befindet sich dann frei im Zytoplasma, nach entsprechender Migration zum *Microtubuli Organizing Center* (MTOC) meist perinukleär (Kim et al. 2001). Die Replikation findet dort durch binäre Fusion mit einer Verdopplungszeit von 9-18 h statt (Tamura et al. 1995; Díaz et al. 2018; Vincent 2016). 72 h nach Infektion wird *O. tsutsugamushi* durch Knospung (*budding*) der Bakterienmembran mit der Zelloberfläche durch die Wirtszelle freigesetzt. Dieser Mechanismus des Zellaustritts ähnelt dem behüllter Viren (Tamura et al. 1995; Díaz et al. 2018). Auch durch Lyse kann das Bakterium aus der Wirtszelle freigesetzt werden und weitere Zellen befallen (Vincent 2016; Díaz et al. 2018).

1.2. Erregerreservoir und Vektor

Das Bakterium *O. tsutsugamushi* wird durch Bisse des Larvenstadiums von Milben aus der Familie der *Trombiculidae*, Gattung *Leptotrombidium* (*L.*) übertragen (Elliott et al. 2019). Die am häufigsten mit *O. tsutsugamushi* infizierten Milbenspezies sind *L. pallidum*, *L. deliense*, *L. scutellare* und *L. fletcheri* (Elliott et al. 2019; Santibáñez et al. 2015).

In Laboruntersuchungen konnte der Lebenszyklus der Milbe *Trombicula akamushi* untersucht werden (Abb. 2). Die adulten männlichen Milben produzieren Spermatophoren und legen diese in der Umwelt ab. Die adulten weiblichen Milben nehmen diese auf, um ihre Eier zu befruchten. Die Eiablage beginnt 6-21 Tage nach Befruchtung, sie kann bis zu 253 Tage anhalten. Dabei werden täglich meist 2-22 Eier, maximal bis zu 41 Eier abgelegt. Ein Weibchen kann bis zu 400 Eier legen (Vincent 2016). Nach 7-11 Tagen rupturiert die abgelegte Eizelle, und eine unreife unbewegliche Larve wird frei (Deutovum). Nach 5-7 Tagen reift eine sechsbeinige Larve heran. Die rötlichen 200 µm großen Larven werden in der englischen Literatur als *chiggers* bezeichnet. Sie bewegen sich nur wenige Zentimeter (bis zu 45 cm) vom Schlupfort auf der Suche nach einem passenden Wirbeltierwirt. Dafür bilden die *chiggers* Cluster, die als Milbeninseln (*mite islands*) bekannt sind (Audy 1968). In diesen Ansammlungen auf Blättern, im Gras, oder auf Zweigen über der Erdoberfläche

können die Larven Monate auf Nahrung warten. Die Larven sind relativ robust, anpassungsfähig und überleben Temperatur- und Feuchtigkeitsschwankungen (Elliott et al. 2019). Optimale Bedingungen stellen Temperaturen 25-30°C und eine Luftfeuchtigkeit von 80% dar (Santibáñez et al. 2015). Die Larven werden durch ausgeatmetes CO₂ vom Wirt stimuliert, Kontakt mit der Haut zu suchen. Sie besitzen ein scharfes Mundwerkzeug namens Chelicerae. Damit formen sie in der Epidermis ein charakteristisches, ca. 120 µm tiefes Nahrungsrohr, das Stylostom. Durch Speichelenzyme der Larve kann Epithel und Lymphgewebe lysiert werden. Von diesen verdauten Gewebeflüssigkeiten ernähren sich die Larven und werden um ein Vielfaches größer. Die Nahrungsaufnahme kann 2-12 Tage und länger dauern. Danach verlassen die Larven den Wirt und kehren zu ihrem Habitat auf der Erdoberfläche zurück. Dort entwickeln sie sich in 3 Tagen in unbewegliche Nymphophanen oder Protonymphen. Nach 7-10 Tagen entwickelt sich eine achtbeinige Deutonymphe, die sich, ebenso wie das adulte Milbenstadium, von Eiern von Arthropoden (Gliederfüßler) sowie toten oder unbeweglichen weichen Insekten ernährt. 2 Wochen später entwickelt sich die Nymphe in die Tritonymphe (teleiophane). Nach 2 Wochen entsteht das adulte Milbenstadium (Elliott et al. 2019).

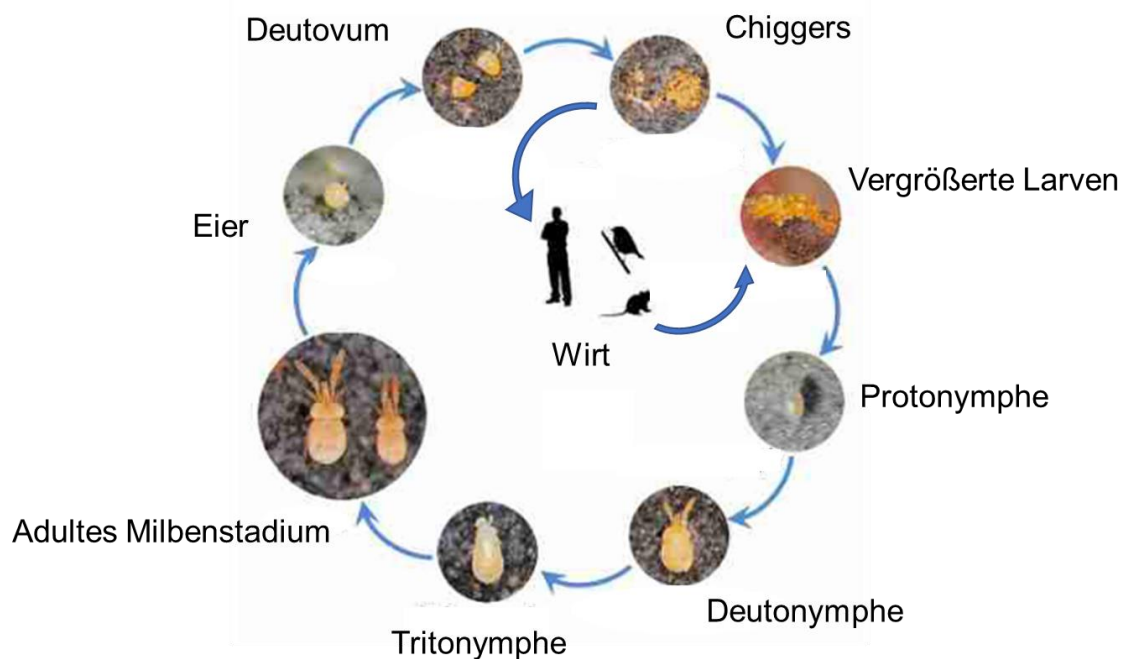


Abb. 2: Schematische Abbildung des Lebenszyklus der *Trombicula akamushi* Milbe
Modifiziert nach Santibáñez et al. 2015.

Wirtstiere der Milben sind v.a. Nager, davon 84% Ratten und Mäuse (Elliott et al. 2019). In 0,5% der Fälle stellen Vögel ein Wirtstier dar und tragen vermutlich durch ihre Flugrouten zu der Verbreitung des Erregers bei. Der Mensch wird als zufälliger Wirt betrachtet (Elliott et al. 2019; Kim et al. 2017; Santibáñez et al. 2015).

95-100% der Milben sind weiblich. Die Weitergabe von *O. tsutsugamushi* geschieht über transovariable und transstadiale Transmission. Dabei wird *O. tsutsugamushi* über die Eizelle sowie über die verschiedenen Lebenszyklen an die Nachfolgenerationen weitergegeben. Organe, in denen das Bakterium gefunden werden konnte, sind in adulten Milben u.a. die Eierstöcke, in den Larven die Speichelorgane. Bisher konnte *O. tsutsugamushi* nicht in den Spermatophoren der Männchen nachgewiesen werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Larven während der Nahrungsaufnahme beim Wirtstier infizieren, auch wurde eine Ansteckung bei gleichzeitig saugenden Larven am gleichen Wirt beobachtet. Dieser horizontale Transfer von *O. tsutsugamushi* ist womöglich ein Grund für die hohe Stammvielfalt in den Milben. Die Larven stellen somit zugleich Vektor und Reservoir für *O. tsutsugamushi* dar (Elliott et al. 2019; Kim et al. 2017; Vincent 2016).

1.2.1. Habitat

Der Lebensraum der Milben ist vielfältig. Sie kommen in Graslandschaften, Parks, Wäldern, Gebirgen, Halbwüsten und Strandvegetation, auf Feldern und an Flussufern vor. Dabei sind nicht nur der ländliche Raum und die Landwirtschaft mit dem Vorkommen von *O. tsutsugamushi* assoziiert, auch semi-urbane und urbane Räume stellen einen zunehmend relevanten Lebensraum für die Milben dar (Elliott et al. 2019).

1.2.2. Infektionsweg und Risikofaktoren

Der Mensch stellt einen Fehlwirt für *O. tsutsugamushi* dar. Kommt es nichtsdestotrotz zu einem Kontakt mit den Larven, kann eine Übertragung des Bakteriums geschehen. Diese benötigt vermutlich eine mehr als sechsstündige Anhaftung der Milbe an den Wirt (Santibáñez et al. 2015). Prädilektionsstellen der Bisse sind die Axilla, die Brustumschlagsfalte, die Leisten, die Genitalregion

und druckassoziierte Stellen am Körper, wie beispielsweise der Hosenbund (Kim et al. 2007; Kundavaram et al. 2013). Eine Gefahr der Infektion besteht bei naturnahen beruflichen oder freizeithlichen Aktivitäten, besonders betroffen sind Landwirt:innen, Plantagenarbeiter:innen, Militärkräfte sowie Menschen bei Freizeitaktivitäten im Freien, in Gärten und Parks. Risikofaktoren stellen bei Tätigkeiten in der Landwirtschaft eine längere Expositionszeit, das vorgebeugte und hockende Arbeiten, das Ruhen auf dem Boden, Fehlen von Schutzkleidung, seltenes Waschen von Kleidung und Haut, sowie die Nutztierhaltung dar (Elliott et al. 2019). Zu weiteren Risikofaktoren für eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* gehören v.a. ein höheres Alter sowie in vielen Arbeiten auch das weibliche Geschlecht. Frauen sind bedingt durch die geschlechterrollenspezifische Arbeits- und Aufgabenverteilung mit regelmäßiger Tätigkeit im Garten besonders gefährdet (Vincent 2016; Bonell et al. 2017).

1.3. Tsutsugamushifieber

Tsutsugamushifieber nennt sich die Erkrankung, die durch eine Infektion mit dem Bakterium *O. tsutsugamushi* hervorgerufen wird. Besondere Aufmerksamkeit im globalen Norden gewann das Bakterium während des 2. Weltkrieges, da viele Militärkräfte – beispielsweise in Vietnam und Indonesien eingesetzt – sich mit der Fieberkrankheit infizierten (Philip 1948; Elliott et al. 2019). Diese wurde bekannt unter dem Namen „Scrub Typhus“ (englisch *scrub* für Unterholz, Gebüsch), da schnell ein Zusammenhang zwischen der Infektion und einer Exposition zu Vegetation erkannt wurde und es klinisch dem Typhus ähnelt (Vincent 2016).

Auch Japanisches Fleckfieber oder Milbenfleckfieber genannt, gehört die Krankheit zu den neu auftretenden Infektionserkrankungen *emerging infections* des globalen Südens. Die Erkrankung stellt ein ernstzunehmendes Gesundheitsrisiko dar. Geschätzt sind 1 Milliarden Menschen gefährdet, sich zu infizieren und mehr als 1 Millionen Tsutsugamushifieber-Fälle treten jedes Jahr auf (Watt und Parola 2003).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) warnt: „*Scrub typhus is probably one of the most underdiagnosed and underreported febrile illnesses requiring hospitalization in the region*“ (World Health Organization 1999). Die Aussage, dass das Tsutsugamushifieber eine vernachlässigte, weit verbreitete, schwere,

jedoch therapierbare Erkrankung ist, besitzt weiterhin Gültigkeit (Paris et al. 2013). Das Wiederaufstreben der Erkrankung, neue Ausbrüche und zunehmende Antibiotikaresistenzen machen die Dringlichkeit der Forschung am Tsutsugamushifieber deutlich (Vincent 2016).

1.3.1. Epidemiologie

Das Tsutsugamushifieber ist endemisch in Zentral-, Ost- und Südostasien. Das sogenannte Tsutsugamushi-Dreieck erstreckt sich von Russland im Norden, Iran im Westen, dem pazifischen Raum im Osten und Australien im Süden. Eingeschlossen sind u.a. Indonesien, die Philippinen, Taiwan, China, die Mongolei, Korea, Japan, Myanmar, Malaysia, Tadschikistan, Thailand, Papua Neu Guinea, Pakistan, Usbekistan, Afghanistan, Indien, die Malediven und Sri Lanka (Kelly et al. 2009; Elliott et al. 2019; Vincent 2016; Bonell et al. 2017). Es existieren zudem vereinzelte Berichte über Scrub Typhus aus Chile (Weitzel et al. 2016), Kenia (Maina et al. 2016) und den Vereinten Arabischen Emiraten (Izzard et al. 2010). Bei Reisenden aus endemischen Gebieten mit typischen Krankheitszeichen sollte das Tsutsugamushifieber als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen werden, außerdem sollte berücksichtigt werden, dass es auch zu Erkrankungen außerhalb des klassischen Verbreitungsgebietes kommen kann (Vincent 2016; Bonell et al. 2017; Elliott et al. 2019).

Die Epidemiologie des Tsutsugamushfiebers ist eng verknüpft mit dem Vorkommen des Milbenvektors. Ihr Habitat ist vielfältig und eine Saisonalität des Tsutsugamushfiebers, bedingt durch Fluktuation in Temperaturen und Niederschlag, lässt sich für viele Gebiete erkennen. Beispielsweise können mehr Milbenlarven in der Monsun- und Regenzeit sowie bei höheren Temperaturen beobachtet werden (Vincent 2016; Traub und Wisseman 1974). Auch werden mehr Fälle von Tsutsugamushifieber in einigen Ländern der nördlichen Breitengrade in den Sommerperioden und in südlicheren Breitengraden in der Regensaison verzeichnet. Für manche Länder konnte bisher keine saisonale Häufung gezeigt werden (Elliott et al. 2019). Ein Zusammenhang zwischen Klimaveränderungen in Form von steigenden Temperaturen und Naturkatastrophen wie Überflutungen und Erdbeben zeichnet sich im Aufstreben der Erkrankung ab (Vincent 2016; Elliott et al. 2019). Das Tsutsugamushifieber dringt in urbane Räume vor, bedingt durch

zunehmende Landnutzung, Urbanisierung und Bevölkerungswachstum. Veränderte Landwirtschaft und Lebensweisen, die mehr Aktivitäten im Freien umfassen, bilden weitere Einflussfaktoren (Vincent 2016; Elliott et al. 2019). Es ist also plausibel, dass eine Kombination aus Klimawandel und menschlicher Expansion steigende Inzidenzen des Tsutsugamushifiebers bedingen (Bonell et al. 2017).

Passive nationale Überwachungs- und Meldesysteme in Südkorea, Japan, China und Thailand verzeichnen einen Anstieg der Inzidenzen. Der Median der Inzidenzen über den Zeitraum von 10 Jahren liegt dabei bei 4,6 Fällen pro 100.000 Einwohner:innen. In Südkorea stieg beispielsweise die Inzidenz um mehr als das 3-fache von 5,7/100.000 in 2001 auf 17,7/100.000 im Jahr 2012. In Japan stieg die Inzidenz um das 6-fache und China um das 8-fache (Bonell et al. 2017; Elliott et al. 2019). Die Seroprävalenz von Antikörpern (IgG und IgM) gegen *O. tsutsugamushi* bei Fieberpatient:innen in den asiatischen Ländern Bangladesch, Indonesien, Laos, Malaysia, Papua Neu Guinea und Sri Lanka beträgt 9%-28%. Bei einem Median von 22% bedeutet das, dass mehr als jede 5. Person in endemischen Tsutsugamushifieber-Regionen Antikörper als Zeichen eines zuvor stattgehabten Kontakts zum Erreger trägt (Bonell et al. 2017). Bis zu 23% der Krankenhausaufnahmen bei undifferenzierten Fiebererkrankungen in Südostasien stellen eine Tsutsugamushifieber-Infektion dar (Elliott et al. 2019). Der Inzidenzanstieg kann zudem durch mehr Aufmerksamkeit für die Krankheit sowie durch mehr und bessere diagnostische Infrastruktur erklärt werden. Jedoch kommt es auch zum Auftreten von Tsutsugamushifieber in Regionen, in denen die Erkrankung bisher noch nicht beschrieben wurde oder lange keine Fälle verzeichnet wurden (Vincent 2016).

1.3.2. Tsutsugamushifieber in Nepal

Das Land Nepal befindet sich mitten im Tsutsugamushi-Dreieck, dem klassischen Endemiegebiet für das Tsutsugamushifieber (Abb. 3).



Abb. 3: Nepal im Endemiegebiet des Tsutsugamushifiebers in Südostasien

Nepal ist grün markiert, das Endemiegebiet blau. Natural Earth Datenmaterial, erstellt mit qGIS Open Source Software.

Die ersten serologischen Hinweise auf das Vorkommen von *O. tsutsugamushi* in Nepal stammen aus dem Jahr 1981 (Brown et al. 1981). Erste dokumentierte Fälle von Tsutsugamushifieber in Nepal sind aus dem Jahr 2001 (Murdoch et al. 2004). Dabei wurden in Kathmandu, der sich auf 1300 m Höhe über dem Meeresspiegel befindenden Hauptstadt Nepals mit mehr als 1,5 Millionen Einwohnenden, Auslöser für Fiebererkrankungen untersucht. Die Antikörper-Seroprävalenz für *O. tsutsugamushi* unter Fieberpatient:innen lag bei 3%. Dabei handelte es sich v.a. um Personen mit Tätigkeit in der Landwirtschaft aus der südlichen, subtropischen Terai-Region. Ein saisonaler Unterschied konnte nicht festgestellt werden (Murdoch et al. 2004). In den Jahren 2002-2004 fanden weitere serologische Untersuchungen zur Abschätzung des Vorkommens von Tsutsugamushifieber in Nepal statt. Es konnte im Vergleich

zur vorherigen Studie mit 22% eine deutlich höhere Seroprävalenz für *Orientia*-Antikörper bei Fiebererkrankten detektiert werden. Ein Zusammenhang mit einem bestimmten Tätigkeitsfeld konnte nicht festgestellt werden (Blacksell et al. 2007b).

Lange Zeit kam der Erkrankung in Nepal wenig Aufmerksamkeit zu, bis zum Jahr 2015. Am 25.04.2015 ereignete sich ein Erdbeben, dessen Epizentrum sich in Zentral-Nepal befand und das eine Stärke von 7-8 erreichte (Thapa et al. 2018). Einige Monate danach traten gehäuft Berichte über Tsutsugamushifieber-Infektionen auf (Basnyat 2016; Nayak 2016). Ein möglicher Grund dafür könnte der enge Kontakt von Menschen und Nagern in temporären Unterkünften nach dem Erdbeben sein. Zu dem Zeitpunkt befanden sich ca. 3 Millionen Menschen in Notunterkünften mit mangelhafter sanitärer Infrastruktur (Basnyat 2016; Nayak 2016). Da das Tsutsugamushifieber bereits vor dem Erbeben in Nepal beschrieben wurde und auch das Vorkommen der Vektorspezies *L. deliense* und *L. imphalum* für *O. tsutsugamushi* in Nepal beschrieben ist (Elliott et al. 2019; Santibáñez et al. 2015; Kim et al. 2017; Dhimal et al. 2021), stellt die Differenzierung saisonaler Ausbrüche und endemischer Muster zwischen Infektionsereignissen im Rahmen von Naturkatastrophen eine Herausforderung dar (Nayak 2016). Eine Kartierungsstudie fand über Modellrechnungen heraus, dass geeignete Umweltbedingungen für das Vorkommen von Tsutsugamushifieber in Nepal existieren und dabei insbesondere das Terai-Flachland und Gebiete mit Agrarflächen herausstechen (Acharya et al. 2019). Untersucht wurden u.a. klimatische und topographische Verhältnisse sowie die Betroffenheit einer Region vom Erbeben und deren Korrelation mit dokumentierten Tsutsugamushifieber-Fällen. Trotz der Hinweise auf eine Assoziation des Auftretens von Tsutsugamushifieber mit der Nähe zum Erdbeben-Epizentrum konnte bei diesen Modellierungen keine signifikante Rolle einer solchen Nähe festgestellt werden. Weiterhin stellten die Autor:innen fest, dass 43% der Population in Nepal, die in Regionen leben, die besonders für das Auftreten des Tsutsugamushifiebers geeignet sind, ein hohes Infektionsrisiko haben (Acharya et al. 2019). Da das Tsutsugamushifieber zu den *emerging infections* in Nepal gehört (Rai 2018), existiert mittlerweile ein Meldesystem für Tsutsugamushifieber-Fälle in Form der nationalen Datenbank der *Epidemiology*

and Disease Control Division (EDCD) des nepalesischen Gesundheitsministeriums. Bei einer Auswertung der Daten von 2015-2017 stellten Dhimel et al. mehr als 1200 gemeldete Tsutsugamushifieber-Fälle in 52 von 75 Distrikten in Nepal fest. Der größte Ausbruch wurde mit 67% der Tsutsugamushifieber-Fälle des untersuchten Zeitraumes für das Jahr 2016 beobachtet und 2015 lag die Fallsterblichkeit bei 6%. Eine Saisonalität konnte für die Monate August bis September dokumentiert werden. Im Jahr 2016 wurden nepalweit 82% der Tsutsugamushifieber-Erkrankten aus der Terai-Region gemeldet (Dhimel et al. 2021). Von 2018-2019 wurden in einer anderen Studie Proben von Patient:innen mit Fieber aus verschiedenen Distrikten in Nepal serologisch auf spezifische Antikörper (IgM und IgG) gegen *O. tsutsugamushi* untersucht. Dabei kristallisierte sich das Tsutsugamushifieber mit einem Anteil von 12% als führender Grund für therapierbares unklares Fieber in Nepal heraus (Pokhrel et al. 2021). Auch konnten saisonale Häufungen verzeichnet werden, mit einem Inzidenzgipfel in der Regenzeit von Juli bis November. Mit 53% waren mehr Frauen durch ihre Haus- und Gartenarbeit sowie Menschen mit Reiseanamnese innerhalb Nepals von der Erkrankung betroffen (Pokhrel et al. 2021). Im Vergleich dazu wurde 2016 eine Prävalenz *Orientia*-spezifischer Antikörper von sogar 40% bei Patient:innen mit unklarem Fieber beschrieben (Upadhyaya et al. 2016). Gautam et al. sprechen von einer 23%-igen Seroprävalenz des Tsutsugamushifiebers bei Fieberkranken mit einer Häufung im Juli und September. Als Risikofaktoren halten die Autor:innen weibliches Geschlecht sowie eine ländliche Wohnsituation mit Bezug zu Graslandschaft und Feldarbeiten fest (Gautam et al. 2019). Insgesamt schwanken die zuvor in Nepal beobachteten Seroprävalenzen von Tsutsugamushifieber bei Patient:innen, die mit Fieber vorstellig wurden, bedingt durch die Wahl unterschiedlicher Tests, Zeitpunkte und Gegenden der Probensammlung. Sie ähneln aber insgesamt dem *Orientia*-Antikörpervorkommen anderer Länder Südostasiens (Elliott et al. 2019; Bonell et al. 2017).

Als mögliche Gründe für den Anstieg von verzeichneten Tsutsugamushifieber-Fällen in Nepal nennen Pokhrel et al. eine erhöhte Aufmerksamkeit von Ärzt:innen für die Erkrankung sowie eine verbesserte Diagnostik in Form von Schnelltests in Nepal (Pokhrel et al. 2021). Dennoch bleibt die Schwierigkeit der

Diagnosestellung anhand der klinischen Untersuchung bei unspezifischer Symptomatik. Häufig liegen zudem Koinfektionen u.a. mit Malaria, Leptospirose, Typhus und murinem Fleckfieber vor (Pokhrel et al. 2021; Basnyat 2016; Blacksell et al. 2007b; Murdoch et al. 2004).

Nepal verfügt über limitierte diagnostische Ressourcen (Nayak 2016). Kommerzielle Schnelltests und molekulare Nachweise mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind teuer und oft nicht verfügbar. Auch stellt die Labordiagnostik selbst, aus technischen Gründen und Mangel an qualifiziertem Personal, eine Herausforderung dar (Basnyat 2016). Murdoch et al. betonen die Wichtigkeit akkurater diagnostischer Tests zur Unterscheidung verschiedener infektionsbedingter Fiebererkrankungen (Murdoch et al. 2004). Blacksell et al. sehen großen Forschungsbedarf zu Hintergrundantikörpern gegen *O. tsutsugamushi* in Nepal und deren Persistenz (Blacksell et al. 2007b) und Basnyat fordert eine verbesserte diagnostische Infrastruktur mit einer schnellen Bereitstellung von Schnelltests (Basnyat 2016). Das Wissen um besonders betroffene Zonen in Nepal kann helfen, effektiv Prioritäten bei Überwachungs- und Kontrollstrategien der Krankheit zu setzen (Acharya et al. 2019).

Festzuhalten bleibt: Das Tsutsugamushiefieber ist offenbar bereits seit längerer Zeit in Nepal endemisch und stellt eine vernachlässigte unter- und fehldiagnostizierte Infektionskrankheit mit aufzuholendem Forschungsbedarf dar. Das nepalesische Gesundheitssystem muss für die schnelle Ausbruchsdetektion und -kontrolle gestärkt werden (Pokhrel et al. 2021; Gautam et al. 2019).

1.3.3. Pathophysiologie und Immunpathogenese

Teile der Pathogenese des Tsutsugamushiefiebers sind im Menschen noch nicht ausreichend untersucht, daher werden Analogien aus Tiermodellen zum besseren Verständnis herangezogen. Es existieren Mausmodelle (Groves und Kelly 1989; Jerrells und Osterman 1981), Modelle in Affen (MacMillan et al. 1985; Robinson et al. 1977, 1981) und humane Modelle *in vivo*, *ex vivo* und *in vitro* (Iwasaki et al. 1997; Kramme et al. 2009; Paris et al. 2012b; Tantibhedhyangkul et al. 2021). Bei den unterschiedlichen Modellen lassen sich relevante bestehende Unterschiede nicht ausschließen. Beispielsweise fehlt in der Maus die pathognomonische Hautläsion nach Milbenbiss, die beim

Menschen auftritt, der sogenannte Eschar (s.u. 1.3.4. Klinik). Eschare treten allerdings wie beim Menschen auch in Affen auf, z.B. in Makaken (Walsh et al. 2007; Paris et al. 2012b).

Der Milbenbiss bleibt häufig schmerzlos und daher zunächst unbemerkt. Nach Hauteintritt lässt sich das Bakterium in regionalen Lymphknoten und danach systemisch nachweisen (Keller et al. 2014; Moron et al. 2001; Tseng et al. 2008). Im Mausmodell zeigen die inneren Organe eine organspezifische Entzündungsantwort mit der höchsten Bakterienlast in der Lunge (Keller et al. 2014). Bei histologischen *ex vivo* Untersuchungen humaner Eschars zeigte sich, dass *O. tsutsugamushi* an der Inokulationsstelle dermale dendritische Zellen sowie aktivierte Monozyten der Haut befällt (Paris et al. 2012b). Durch diese Zellen kann dann die Disseminierung zu den regionalen Lymphknotenstationen und die anschließende systemische Streuung u.a in Leber- und Milzmakrophagen erfolgen (Díaz et al. 2018; Paris et al. 2012b; Moron et al. 2001). Das Bakterium befällt außerdem Endothelzellen (Moron et al. 2001), deren Aktivierung mit dem Ausschütten von Entzündungsmediatoren und Zelluntergang einhergeht (Tantibhedhyangkul et al. 2021). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von *O. tsutsugamushi* infizierten Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) von bereits mit *O. tsutsugamushi* infizierten Monozyten vermittelt wird (Tantibhedhyangkul et al. 2021). Die induzierte fokale sowie die disseminierte Vaskulitis führen zu Organschäden. Der Gefäß-Tropismus trägt zur Vielfalt der klinischen Symptomatik bei (Vincent 2016; Díaz et al. 2018). Weitere Studien *in vivo* zeigen, dass die Gerinnungsaktivierung bei Patient:innen mit Tsutsugamushifieber prominent und stark mit der pro-inflammatorischen Immunantwort verbunden ist (Paris et al. 2012a). Das Tsutsugamushifieber ist charakterisiert durch eine Monozyten- und Makrophagen-Aktivierung sowie die Zirkulation endothelialer Entzündungsparameter, insbesondere von YKL-40 (*Chitinase-3-like Protein 1*), das in Zusammenhang mit einer erhöhten Gerinnungsaktivierung steht (Otterdal et al. 2014).

Bei der immunologischen Interaktion zwischen *O. tsutsugamushi* und dem Wirtsorganismus sind die Wechselbeziehungen zum angeborenen und zum erworbenen Immunsystem zu unterscheiden.

Als Teil des angeborenen Immunsystems werden zu Beginn einer Infektion zunächst dendritische Zellen aktiviert. Es kommt *in vitro* 24h nach der Infektion u.a. zur Hochregulation von *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHCII)-Molekülen und einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen. Dazu gehören z.B. TNF- α sowie die pro-inflammatorischen akute-Phase-Proteine induzierenden Zytokine Interleukin (IL)-6, IL-8 und IL-12p70 (Choi et al. 2013; Chu et al. 2013).

Infizierte dendritische Zellen wandern in Lymphknoten ein, um dort naive, antigenspezifische T-Zellen zu primen (Martín-Fontecha et al. 2009). Dies geht einher mit einer Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ), einem Mediator der Entzündungsantwort. Durch T-Zellen induziert, stimuliert IFN- γ Makrophagen und Monozyten und verbessert die Antigenpräsentation. *O. tsutsugamushi* induziert andererseits die Produktion von IL-10, welches wiederum TNF- α , IL-1b und IL-6 inhibiert (Kim et al. 2006b). Dadurch überleben mehr Bakterien in den Phagozyten. Bei genesenen zuvor schwer erkrankten Patient:innen mit Zytokinsturm als auch *in vitro* bei mit hohen *Orientia*-Dosen infizierten Makrophagen lassen sich allerdings eher verminderte IL-10 Konzentrationen und erhöhte Konzentrationen von pro-inflammatorischem TNF- α , IL-1b und IL-6 finden (Díaz et al. 2018; Tsai et al. 2016). Im Mausmodell zeigten Soong et al. insgesamt erhöhte IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α Serumkonzentrationen nach einer *Orientia*-Infektion (Soong et al. 2016).

Es besteht ein Anhalt für einen Zusammenhang zwischen der im Blut gemessenen Bakterienlast und der Konzentration bestimmter Zytokine (Kramme et al. 2009). In den ersten 10 Tagen der Infektion (akute Phase) wurden signifikant höhere IFN- γ und IL-10 Konzentrationen im Vergleich zum Zeitpunkt der Genesung verzeichnet, wobei TNF- α und IL-1b keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Höhere IL-10 Konzentrationen gehen außerdem mit höheren, mittels real time (rt) 56kD quantitativer (q)PCR gemessenen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Konzentrationen in Vollblut einher. Für die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-1b konnte kein Zusammenhang mit einer höheren Bakterienlast hergestellt werden (Kramme et al. 2009). Es gibt Anzeichen, dass erhöhte inflammatorische Zytokine wie *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule* (ALCAM), *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1), *Macrophage Inhibitory Factor* (MIF) und auch TNF- α

Einfluss auf die Schwere der Erkrankung und das klinische Outcome haben (Otterdal et al. 2014; Kim et al. 2019a).

Die erworbene Immunreaktion ist einerseits charakterisiert durch die Antikörperbildung gegen immundominante Antigene von *O. tsutsugamushi*, andererseits wird im Rahmen der zellvermittelte Immunität eine T-Zell-Antwort generiert, deren Spezifität bislang noch nicht gut untersucht ist. Zu den bekannten immundominanten Proteinen gehören u.a. das 47kD und das 56kD Protein. Die humorale Immunantwort kennzeichnet sich durch einen Anstieg der Antikörpertiter (IgM und IgG) 2 Wochen nach der Infektion. Dieser fällt relativ rasch wieder ab und liegt nach 40 Monaten unter der Nachweisgrenze (Kim et al. 2010; Saunders et al. 1980). Humanversuche mit Freiwilligen der 1950er Jahre ergaben, dass eine sogenannte homologe Immunität gegen Infektionen mit demselben *Orientia*-Stamm über die Bildung stammspezifischer Antikörpern entsteht, die einen Schutz für einige Jahre bietet. Die Antikörper erhöhen die Phagozytose von *O. tsutsugamushi*. Dagegen besteht eine sogenannte heterologe Immunität gegen andere *Orientia*-Stämme nur für kurze Zeit (Smadel et al. 1950; Smadel et al. 1952a). Oftmals kann eine Infektion durch vorhandene Antikörper nicht vollständig – im Sinne einer sterilen Immunität – verhindert werden, sie schwächen diese jedoch ab und können das Auftreten von Symptomen verhindern. Eine Bakteriämie zeigt sich dennoch. Diese Beobachtungen wurden im Affenmodell gemacht (Chattopadhyay und Richards 2007; Robinson et al. 1981).

Bei phänotypischen Charakterisierungen von peripheren T-Zellen in südkoreanischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen zeigten sich während einer akuten Infektion aktivierte zytotoxische CD8+ T-Zellen und eine CD4+ Lymphozytopenie. Insgesamt wurden verminderte regulatorische T-Zellen während der Erkrankung beobachtet (Cho et al. 2012). *Ex vivo* Messungen zeigen ein Jahr nach einer *Orientia*-Infektion eine rapide Abnahme der 56kD TSA antigenspezifischen, IFN- γ sekretierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen (Ha et al. 2017). Diese Beobachtungen lassen Rückschlüsse auf einen Verlust der zellvermittelten Immunität zu (Cho et al. 2012; Ha et al. 2017).

Ein großer Teil des Verständnisses stammt auch hier aus Mausmodellen. Aktivierte CD8+ T-Zellen wandern in die Milz und in die Lunge (Hauptmann et al. 2016; Xu et al. 2017) und verursachen Gewebeschäden in Leber und Lunge

durch die Rekrutierung von Makrophagen (Hauptmann et al. 2016). Xu et al. zeigten, dass CD8+ T-Zellen aber auch einen Schutz bei einer *Orientia*-Infektion bieten können (Xu et al. 2017). Sie reduzieren die Bakterienlast, und hemmen deren Wachstum bei einer akuten und einer persistierenden Infektion (Hauptmann et al. 2016). Bei Lymphozyten gibt es einen Hinweis auf deren Verantwortlichkeit für eine Kreuzimmunität gegenüber verschiedenen Stämmen, dies konnte im Mausmodell bei Lymphozyten der Milz und aus Peritonealexsudat beobachtet werden (Jerrells und Osterman 1983). CD8+ T-Zellen scheinen insgesamt vor einem letalen Krankheitsausgang zu schützen. Experimentelle Daten legen ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen Krankheitslast durch die Infektion und einer potentiell schädlichen T-Zell vermittelten Immunantwort nahe (Hauptmann et al. 2016).

1.3.4. Klinik

Das Tsutsugamushifieber ist in vielen Fällen eine milde, selbstlimitierende Erkrankung, die jedoch v.a. unbehandelt einen schweren Verlauf bis hin zum Versterben nehmen kann (Vincent 2016; Taylor et al. 2015).

Durch kutane Bisse von Milbenlarven wird das Bakterium *O. tsutsugamushi* übertragen. Da schmerzlos, bleibt die Bissstelle häufig unbemerkt. Es kann sich eine Papel als Primärläsion bilden, die ulzeriert und sich im weiteren Verlauf zu einer nekrotischen Läsion mit dunkler Kruste entwickelt. Diese pathognomonische Hauterscheinung, die einer Zigarettenbrandverletzung ähnelt, wird Eschar genannt (Abb. 4). Ein Eschar kommt nicht bei allen Infizierten vor. Die Zahlen dazu variieren. In einer Studie aus Südindien konnte in 55% der untersuchten Fälle ein Eschar festgestellt werden (Varghese et al. 2013). In einer aktuellen Untersuchung aus Nepal lag in 9% der Fälle ein Eschar vor (Pokhrel et al. 2021).



Abb. 4: Foto eines Eschars von einem Tsutsugamushifieber-Patienten in Nepal

Abdomen auf Höhe des Hosenbundes. Unpubliziertes Foto: Anil Pokhrel (*Central Department of Microbiology, Tribhuvan Universität, Kathmandu, Nepal*).

In der Folge kann es zu einer schmerzhaften Schwellung der regionalen Lymphknoten kommen. Die Inkubationszeit beträgt meist 7-10 Tage und kann zwischen 6 und 21 Tagen variieren. Oft bleibt die Krankheit asymptomatisch, die meisten Symptome zeigen nach der systemischen Streuung ein grippeähnliches Erscheinungsbild mit Fieber, Schüttelfrost, Kopf-, Glieder- und Gelenkschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Konjunktivitis und unproduktivem Husten. Auch werden eine generalisierte Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie mit Transaminasenerhöhung (Pokhrel et al. 2021) und ein stammbetontes, makulopapulöses Exanthem 5-8 Tage nach Fieberbeginn beschrieben. Unbehandelt kann das Fieber 9-18 Tage lang andauern, im Median dauert es 14 Tage (Taylor et al. 2015). Ohne eine antibiotische Therapie mit Tetracyclinen oder Makroliden kann es zu systemischen Komplikationen kommen. Dazu gehören Myokarditis, Luftnot mit interstitieller Pneumonie bis zum akuten Lungenversagen (ARDS), Enzephalitis, Nierenversagen, disseminierte intravasale Gerinnungsstörung (DIC) mit Thrombozytopenie und Schock (Vincent 2016; Levine 1946; Varghese et al. 2013; Pokhrel et al. 2021; Sriwongpan et al. 2013). In einer thailändischen Studie handelt es sich beim Auftreten von mindestens einer Organdysfunktion bereits um einen schweren Verlauf (Sriwongpan et al. 2013). In 38% der

Tsutsugamushifieber-Fälle einer südindischen Studie lag ein Multiorganversagen vor (Varghese et al. 2013).

Bei unbehandelten symptomatischen Patient:innen mit einer Tsutsugamushifieber-Labordiagnose schwankt die Mortalität zwischen 0 und 70%, die Mortalität im Median beträgt 6%, behandelt liegt diese bei 1,5% (Taylor et al. 2015; Bonell et al. 2017; Elliott et al. 2019). Ein erhöhtes Sterblichkeitsrisiko besteht zudem bei höherem Alter, hoher Bakterienlast und einem schweren Verlauf: insbesondere bei einer katecholaminpflichtigen Hypotension, Myokarditis, ARDS und DIC (Taylor et al. 2015; Varghese et al. 2013; Adhikari et al. 2020).

1.3.5. Differentialdiagnosen und Schweres Fieber mit Thrombozytopenie-Syndrom (SFTS)-Virus-Infektion

Aufgrund der oftmals ähnlichen klinischen Präsentation von Erkrankungen durch andere Infektionserreger, entsteht für behandelnde Ärzt:innen die Problematik, zwischen diesen zu differenzieren. Wichtige Differentialdiagnosen zum Tsutsugamushifieber sollten daher in der Diagnostik akuter undifferenzierter fieberhafter Erkrankungen in Endemiegebieten berücksichtigt werden. Auch Koinfektionen mit und bei Tsutsugamushifieber sollten bedacht werden. Zu diesen gehören Malaria, Dengue-Fieber, andere Rickettsiosen u.a. das durch *Rickettsia typhi* verursachte murine Fleckfieber, *Salmonella typhi*-Infektionen (Typhus abdominalis), Leptospirose, Brucellose, viszerale Leishmaniose, Meningokokken- und *Mycoplasma pneumoniae*-Infektionen, sowie das SFTS-Virus (Basnyat 2016; Blacksell et al. 2007b; Murdoch et al. 2004; Pokhrel et al. 2021; Liu et al. 2014; Kim et al. 2018). Zwar existieren spezifische Symptome des Tsutsugamushiefiebers, wie z.B. ein Eschar, sie sind jedoch nicht immer vorhanden (Pokhrel et al. 2021). Differentialdiagnosen und Koinfektionen sollten daher insbesondere dann in Betracht gezogen werden, wenn es unter empirischer Antibiose nicht zur Entfieberung kommt (Vincent 2016).

Das „Schweres Fieber mit Thrombozytopenie-Syndrom“ wird durch das SFTS-Virus hervorgerufen. Das Phlebovirus aus der Familie der Bunyaviren ist ein durch Zecken der Spezies *Haemaphysalis longicornis* übertragenes zoonotisches Virus, das erstmals 2009 in China bei Fieberpatient:innen

beschrieben wurde (Yu et al. 2011). Jährlich werden 100-1000 Fälle beschrieben, mittlerweile auch in Südkorea und Japan, die Mortalität liegt zwischen 6 und 33% (Sun et al. 2017; Choi et al. 2016). Risikofaktoren für eine Infektion stellen Tätigkeiten in der Landwirtschaft, Grasexposition und Aktivitäten im Freien dar. Die Krankheit manifestiert sich mit hohem Fieber, grippeähnlicher Symptomatik wie Kopf- und Gliederschmerzen und Thrombozytopenie (Liu et al. 2014). Da nicht nur die Risikofaktoren Parallelen zum Tsutsugamushifieber zeigen, sondern auch die klinische Präsentation Überschneidungen mit dem Tsutsugamushifieber aufweist, stellt eine Infektion mit STFS-Virus sowohl eine zu berücksichtigende Differentialdiagnose als auch eine mögliche Koinfektion dar (Sato et al. 2017; Thi Hai Yen et al. 2019; Wi et al. 2016; Yoo et al. 2018; Kim et al. 2018).

1.3.6. Diagnostik

Die Diagnosestellung des Tsutsugamushiefiebers stellt eine Herausforderung dar. Schwierigkeiten und Limitationen werden bedingt durch die oft unspezifische klinische Manifestation und die begrenzten diagnostischen Möglichkeiten in vielen Endemieländern. Die Diagnostik setzt sich zusammen aus Anamnese, klinischer Untersuchung, Serologie und dem direkten Erregernachweis.

Auf Basis der WHO-Empfehlungen gibt es eine abgewandelte Tsutsugamushifieber-Falldefinition aus Thailand, bei der folgende Kriterien erfüllt sein müssen: Stattgehabte *chiggers*-Exposition, Aufenthalt in einem Endemiegebiet innerhalb von 2 Wochen vor Symptombeginn sowie akutes Fieber in den 2 Wochen seit Symptombeginn. Zwei Kriterien müssen davon zutreffen. Zusätzlich muss entweder Kopfschmerz, Gliederschmerz, Schwitzen, Husten, Konjunktivitis, Lymphadenopathie oder ein makulopapulöses Exanthem vorliegen. Hinzukommen muss zudem ein Eschar oder ein positiver immunchromatographischer Schnelltest (Sriwongpan et al. 2013; World Health Organization 1999).

Angelehnt an die Fallklassifikationen der WHO differenziert die EDCC Nepal zwischen 3 Kategorien:

Ein klinischer Verdachtsfall besteht bei akutem klinisch undifferenziertem Fieber von mindestens 5 Tagen, ohne das Vorliegen eines Eschars. Gibt es einen

Eschar, sollte der Verdacht auf Tsutsugamushifieber auch bei weniger als 5 Tage Fieber erhoben werden.

Ein wahrscheinlicher Fall liegt vor, wenn der klinische Verdacht besteht und zusätzlich ein *Orientia*-spezifischer IgM-Antikörpertiter >1:32 oder ein 4-facher Titeranstieg einer gepaarten Serumprobe vorliegt.

Um einen bestätigten Fall handelt es sich bei einem *Orientia*-positiven PCR Nachweis aus Vollblut oder einer Escharbiopsie oder wenn steigende Antikörper Titer in der indirekten Immunfluoreszenz Antikörper Testung (IFAT) oder im indirekten Immunperoxidase-Assay (IPA) in zwei Seren, aus dem akuten Infektionsstadium und der Rekonvaleszenzphase, vorliegen (Epidemiology and Disease Control Division 2015; World Health Organization 1999). Zusätzliche Hinweise auf eine Infektion mit *O. tsutsugamushi* können die anamnestisch erhobenen Risikofaktoren sowie eine Entfieberung 48h nach Antibiotikagabe liefern (Vincent 2016; World Health Organization 1999; Watt et al. 1996).

Zur serologischen Labordiagnostik aus Blutserum gehören u.a. der Weil-Felix-Test und der IPA. Beim Weil-Felix-Agglutinationstest wird Serum mit inaktivierten Bakteriensuspensionen von *Proteus mirabilis* in einer Mikrotiterplatte inkubiert und die Agglutination optisch bewertet. Der Test beruht auf einer serologischen Kreuzreaktivität von *O. tsutsugamushi* IgM-Antikörpern mit *P. mirabilis*-Antigen (Serovar OXK). Beim IPA werden *Orientia*-Antigene genutzt, die potentiell vorhandene *Orientia*-Antikörper binden, dabei ist der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase markiert. Die beiden Tests stellen trotz niedriger Sensitivität und Spezifität eine erschwingliche einfach verfügbare Option zur Diagnosestellung im klinischen Kontext dar (Vincent 2016).

Als Goldstandard wird die IFAT betrachtet. Dabei werden Objektträger, die mit infizierten Zellkulturen beschichtet sind, verwendet. Die hierfür am häufigsten genutzten Antigene sind die Serotypen Karp, Kato und Gilliam. Je nach Region sollten auch lokal vorkommende Serotypen berücksichtigt werden (Blacksell et al. 2007a). In einigen Studien gelten Personen mit einem IgM-Titer $\geq 1:400$ einer einzelnen Serumprobe oder der mindestens 4-fache Titeranstieg zwischen zwei Proben als mit dem Tsutsugamushifieber erkrankt (Blacksell et al. 2007a; Sonthayanon et al. 2006). In anderen Studien werden bereits Titer von >1:50 als diagnostisches Kriterium genutzt (Bonell et al. 2017). Titergrenzen (Cut-off

Titer) führen häufig zu falsch positiven Ergebnissen, insbesondere bei einfacher Testung und ihre Vergleichbarkeit zwischen Laboren ist nicht gegeben (Blacksell et al. 2007a). Gemäß des Reviews von Blacksell et al., in der unterschiedliche Studien zur diagnostischen Genauigkeit von Cut-off Titern untersucht wurden, sollte in endemischen Gebieten ein lokaler Grenzwert etabliert werden, der auf der Tsutsugamushifieber-Seroprävalenz von *Orientia*-spezifischen IgM- und IgG-Antikörpern in der gesunden Bevölkerung basiert (Blacksell et al. 2007a). Dadurch lassen sich akute von vorangegangenen Infektionen mit noch bestehenden Antikörpern besser unterscheiden (Blacksell et al. 2007a). Nichtsdestotrotz bleibt die indirekte Immunfluoreszenz eine subjektive Methode, die von erfahrenem Personal durchgeführt werden sollte, da eine optische Beurteilung der Fluoreszenz am Mikroskop stattfinden muss. Sie ist bezüglich der Titer zwischen verschiedenen Laboratorien nicht oder eben nur begrenzt vergleichbar und darüber hinaus mit hohen Kosten verbunden, sowie von dem Vorhandensein eines Fluoreszenzmikroskops abhängig. Die für die Durchführung erforderlichen personellen, finanziellen und materiellen Ressourcen sind in vielen Endemiegebieten rar.

Eine Alternative zur IFAT bieten *Orientia*-IgM *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA), bei welchen es nach Antikörperbindung mit auf Mikrotiterplatten aufgetragenem rekombinantem 56kD Antigen zu einer enzymatischen Farbreaktion kommt, die dann mit Hilfe eines Photometers gemessen wird. Sie bieten eine ähnliche Sensitivität und Spezifität wie die IFAT, sind allerdings ebenfalls kostspielig und in Regionen mit limitierter Infrastruktur schwer verfügbar (Vincent 2016).

Da der Zeitfaktor in der Diagnosestellung des Tsutsugamushiefiebers ausschlaggebend ist, bieten Schnelltests (*Rapid Diagnostic Tests* (RDT)) die Möglichkeit einer frühen, akkuraten Diagnosestellung. Basierend auf dem Prinzip der Immunchromatographie weisen derzeit verfügbare Tests schwankende Sensitivitäten und hohe Spezifitäten über 90% auf (Blacksell et al. 2010; Blacksell et al. 2012). Einen Vorteil bieten sie in der leichten Handhabung und den wenigen Ressourcen, die für eine Durchführung von Nöten sind.

Die Anzucht von *O. tsutsugamushi* in Zellkultur oder Mäusen aus klinischem Probenmaterial kann ebenfalls die Diagnose sichern. Hierfür ist allerdings ein

BSL3-Labor erforderlich und das langsame Wachstum des Bakteriums ist für die rasche Diagnosestellung in der klinischen Versorgung nicht hilfreich. Die Anzucht ist dementsprechend für diagnostische Zwecke zu aufwendig und eher dem wissenschaftlichen Rahmen vorbehalten.

Für den direkten Erregernachweis von *O. tsutsugamushi* lässt sich die Polymerasekettenreaktion (PCR) einsetzen, die häufig im Rahmen von Studien durchgeführt wird. Insbesondere im frühen Infektionsstadium, wenn noch keine Antikörperentwicklung stattgefunden hat, kann die PCR ein wichtiges diagnostisches Mittel sein (Kim et al. 2010; Kannan et al. 2020). Als Probenmaterial dient Vollblut oder der Leukozytenfilm einer abzentrifugierten Blutprobe, Buffy Coat genannt, der viele intrazelluläre *O. tsutsugamushi* Bakterien enthält (Vincent 2016; Walsh et al. 2001). Alternativ kann die Biopsie eines Eschars, sofern vorhanden, als Probenmaterial dienen (Lee et al. 2006; Kim et al. 2006a).

Als Zielstrukturen der PCR werden u.a. Sequenzen aus den Genen der *Orientia*-spezifischen 56kD und 47kD Membranproteingene sowie konservierte Bereiche der 16S rRNA eingesetzt (Jiang et al. 2004; Sonthayanon et al. 2006). Die PCR gilt als sensitiver als die IFAT aus Serum, allerdings variieren die Angaben zu Sensitivität und Spezifität je nach Quelle. Größere Studien zeigen Sensitivitäten von 45% und 29% (Sonthayanon et al. 2006). Eine konventionelle 16S rRNA PCR stellte sich beispielsweise sensitiver heraus als PCRs mit anderen Zielstrukturen (47kD, 56kD), unabhängig ob konventionell, nested oder real time (Kim et al. 2016a). Bei Verwendung des 56kD Gens als sehr spezifisches aber variables Target, kann die hohe Sequenzvariabilität innerhalb des Gens zu unvollständiger Bindung der Oligonukleotide führen (Sonthayanon et al. 2006).

Die klinisch relevante diagnostische Sensitivität von PCRs zum Nachweis von *O. tsutsugamushi* ist daher abhängig von unterschiedlichen Faktoren, beispielsweise der Wahl des Probenmaterials. Das PCR-Verfahren insgesamt ist eine teure und aufwendige Labormethode, die ausgebildetes Fachpersonal und eine spezielle Laborausstattung (Reagenzien, Geräte) erfordert. Es existieren noch keine internationalen Standards und die ideale molekulare Zielstruktur ist derzeit noch offen (Vincent 2016).

1.3.7. Therapie

Therapeutisch stehen bei Tsutsugamushifieber heutzutage verschiedene Antibiotika zur Verfügung. Dazu gehören v.a. Doxycyclin und Azithromycin, aber auch Tetracyclin und Chloramphenicol, die die bakterielle ribosomale Biosynthese hemmen (Kock et al. 2018), sowie Rifampicin, das die RNA Transkription durch die bakterielle RNA-Polymerase hemmt (Wee et al. 2017; Smadel et al. 1948; Sheehy et al. 1973; Saraswati et al. 2021).

Zur Wirksamkeit von anderen Makroliden und Fluorchinolonen gibt es wenig Evidenz (Wee et al. 2017; Rajapakse et al. 2011; Tantibhedhyangkul et al. 2010). Im Menschen, im Tiermodell und *in vitro* zeigen sich u.a. Beta-Laktam-Antibiotika unwirksam, da *O. tsutsugamushi* keine Peptidoglykane besitzt (Wangrangsimakul et al. 2020; Amano et al. 1987).

Doxycyclin wird in vielen Studien als besonders schnell und am besten wirksam angesehen (Fang et al. 2012; Rajapakse et al. 2011; Smadel et al. 1948; Saraswati et al. 2021). Nach der Erstgabe findet innerhalb von 24-36 h eine Entfieberung statt, die auch als sekundäres diagnostisches Kriterium nach Stellung einer klinischen Verdachtsdiagnose genutzt werden kann, insbesondere wenn keine Labordiagnostik zur Verfügung steht (Watt et al. 1996). Die Antibiose führt zu einem deutlichen Rückgang der inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1b und IL-6 (Chung et al. 2007). Die Wirkung der genannten Antibiotika, v.a. Doxycyclin, gegenüber *O. tsutsugamushi* ist allerdings eher bakteriostatisch, nicht bakterizid (Im et al. 2014). Durch sie wird die Bakterienvermehrung gehemmt während die adaptive Immunantwort ausgebildet wird. Aus diesem Grund sollte die Therapie nicht zu früh beendet werden, da sonst noch nicht ausreichend Antikörper und spezifische T-Zellen gebildet werden konnten (Im et al. 2014). Es gibt inzwischen mehrere Hinweise, dass *O. tsutsugamushi* trotz antibiotischer Therapie nicht vollständig aus dem Körper eliminiert wird und latent persistiert (Smadel et al. 1952b; Chung et al. 2012).

Doxycyclin weist im Vergleich zur gängigen Alternative Azithromycin mehr beobachtete unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, auf (Fang et al. 2012; Liu und Panpanich 2018). Das die Proteinbiosynthese des Bakteriums hemmende Makrolid Azithromycin eignet sich insbesondere auch zur Therapie des Tsutsugamushfiebers bei Kindern

und Schwangeren (Kim et al. 2006c), ist im Vergleich zu Doxycyclin aber teurer (Wee et al. 2017; Rajapakse et al. 2011; Saraswati et al. 2021; Wangrangsimakul et al. 2020).

Therapeutisch kann das ebenfalls das Antibiotikum Rifampicin eingesetzt werden, besonders wenn Doxycyclin-Resistenzen (s.u.) bestehen (Rajapakse et al. 2011; Wangrangsimakul et al. 2020; Im et al. 2014). Rifampicin sollte allerdings nicht als Erstlinienpräparat genutzt werden, da es Resistenzen bei undiagnostizierter Tuberkulose hervorrufen kann. Es sollte vor einer Zweitlinientherapie mit Rifampicin unbedingt eine aktive Tuberkulose ausgeschlossen werden (Liu und Panpanich 2018).

Liu und Panpanich halten nach Beobachtungen aus randomisiert kontrollierten Studien in 3 Ländern zu Antibiotikaregimen bei Tsutsugamushifieber fest, dass insgesamt kein großer Unterschied der Wirksamkeit zwischen Doxycyclin, Azithromycin, Tetracyclin und Rifampicin besteht und alle Substanzen eine Behandlungsoption darstellen (Liu und Panpanich 2018).

Verschiedene Reviews haben Studien zur Therapie des Tsutsugamushiefiebers in endemischen Regionen bereits ausgewertet und miteinander verglichen (Saraswati et al. 2021; Liu und Panpanich 2018; Rajapakse et al. 2011; Wee et al. 2017; Fang et al. 2012). Dabei wurde festgestellt, dass die zur Verfügung stehenden Daten eine hohe Heterogenität aufweisen, welche die Diagnosestellung und die verabreichte Medikation, insbesondere ihrer Dosierung und Dauer, betrifft (Saraswati et al. 2021). Dies macht es schwierig, die Daten direkt miteinander zu vergleichen. Zu den häufig untersuchten Parametern gehörten Entfieberung innerhalb von 48h, Dauer bis zur Entfieberung, klinisches Ansprechen, Komplikationen, unerwünschte Arzneimittelwirkungen, Therapieversagen und Mortalität (Saraswati et al. 2021; Liu und Panpanich 2018). Saraswati et al. heben in ihrem systematischen Review von Studien aus den Jahren 1998 bis 2020 erneut hervor, dass das Tsutsugamushifieber eine vernachlässigte Erkrankung ist, für die ein Konsens zum Therapieregime bislang fehlt. Sie stellen fest, dass bislang wenige oder keine evidenzbasierten Therapieempfehlungen existieren (Saraswati et al. 2021).

Für Nepal empfiehlt die EDCC Nepal derzeit für Erwachsene Azithromycin 500mg oral als Einzeldosis oder Doxycyclin 100mg oral 2x täglich für 5-10

Tage. Kindern und Schwangeren wird Azithromycin empfohlen. Die Behörde nennt als Ausweichmöglichkeit Chloramphenicol (Epidemiology and Disease Control Division 2015). Da die meiste klinische Evidenz zur Wirksamkeit der Antibiotika für leichtere Krankheitsverläufe dokumentiert ist, sind weitere Arbeiten zu deren Wirksamkeit bei schweren lebensbedrohlichen Verläufen nötig (Rajapakse et al. 2011).

Einen weiteren zu beleuchtenden Aspekt stellen Antibiotikaresistenzen dar. Es gibt Hinweise aus Nordthailand und Südindien bezüglich eines reduzierten Ansprechens auf Chloramphenicol und Doxycyclin. Dabei wurde eine verzögerte Entfieberung von 30h auf 80h beobachtet (Bonell et al. 2017; Watt et al. 1996; Rajapakse et al. 2011). In einer aktuellen Studie wird diese allerdings in Frage gestellt, da eine mögliche Doxycyclinresistenz bislang nur teilweise *in vitro* nachvollzogen werden konnte (Watt et al. 1996; Wangrangsimakul et al. 2020).

Nichtsdestotrotz können neue Stoffe mit antimikrobieller Wirkung auf *O. tsutsugamushi*, wie das Coralopyronin A (CorA), das die bakterielle RNA-Polymerase an einem anderen Target als die Rifamycine hemmt, neue Therapiemöglichkeiten bieten (Kock et al. 2018).

1.3.8. Prävention

Zur Vorbeugung einer Tsutsugamushifieber-Infektion ist die Expositionsprophylaxe mit Reduktion des Milbenbissrisikos derzeit am effektivsten. Schutz bieten lange, körperbedeckende Kleidung und Schuhwerk, Vermeidung von Sitzen und Liegen auf dem Boden, das Wechseln und Waschen von Kleidung und Körper nach Aufenthalt im Freien und die Anwendung von Insektenrepellents (Sharma et al. 2009; Kim et al. 2012; Elliott et al. 2019). Als weitere Intervention gilt die Kontrolle von Nagerpopulationen und die Eindämmung von Vegetation (Hengbin et al. 2006). Bei besonderer kurzzeitiger Expositionsgefährdung in endemischen Regionen kann auch eine Chemoprophylaxe in Betracht gezogen werden (Olson et al. 1980; Twartz et al. 1982).

Eine wichtige Rolle in der Prävention von Infektionen spielt die Impfstoffentwicklung. Bei bisher in Mensch- und Tiermodellen (Maus und Affe) experimentell untersuchten *O. tsutsugamushi* Tot- und Lebendimpfstoffen sowie

attenuierten Impfstoffen mit bestrahlten *O. tsutsugamushi* Bakterien ließ sich zwar eine homologe Immunität beobachten, allerdings stellte sich keine lang anhaltende heterologe Immunität ein (Chattopadhyay und Richards 2007). Eine wichtige Rolle spielt dabei die hohe genetische und antigenetische Diversität des Bakteriums. Potentielle Impfstoffe sollten möglichst breit die vorhandenen Stammprävalenzen mit den höchsten Virulenzen abdecken und dabei geographische Unterschiede berücksichtigen (Kelly et al. 2009; Chattopadhyay und Richards 2007). Vielversprechend sind derzeit sowohl rekombinante Protein-Vakzine mit dem 56kD oder 47kD Antigen, als auch DNA-Vakzine, die immundominante *O. tsutsugamushi* proteinkodierende Gene enthalten, welche nach Applikation vom Wirt selbst exprimiert werden (Chattopadhyay und Richards 2007).

Solange die Impfstoffkandidaten evaluiert werden, existiert noch kein wirksamer verfügbarer Impfstoff für den Menschen. In Nepal empfiehlt die EDCC daher aktuell eine medikamentöse Prophylaxe für den Aufenthalt in endemischen Regionen mit Chloramphenicol oder Tetracyclin oral als Einzeldosis (100-200 mg) alle 5 Tage über einen Zeitraum von bis zu 35 Tagen. Zur Prävention nennt die Behörde Schutzkleidung, festes geschlossenes Schuhwerk, Insektenrepellents auf Benzylbenzoat-Basis für Haut und Kleidung, das Vermeiden von Sitzen oder Liegen auf dem Boden oder im Gras, sowie die Vegetationskontrolle und die Verwendung von Insektiziden für den Boden (Epidemiology and Disease Control Division 2015).

1.4. Fragestellung

Nepal liegt inmitten des asiatischen Endemiegebietes des Tsutsugamushiefiebers. In der Literatur lassen sich viele Hinweise auf die Existenz der Erkrankung im Land finden. Trotz bereits bestehenden Untersuchungen zur Tsutsugamushiefieber-Epidemiologie in Nepal, existieren noch keine Daten zur Immunantwort in der gesunden nepalesischen Bevölkerung, insbesondere der Seroprävalenz von *Orientia*-spezifischen Antikörpern. Systematische Informationen zur molekularen Epidemiologie und Typisierung von *Orientia tsutsugamushi* in Nepal (Gautam et al. 2021) sind bislang begrenzt. Auch Fragen zur Persistenz von *O. tsutsugamushi* und Koinfektionen von Tsutsugamushiefieber mit SFTS-Virus in Nepal sind offen.

Vor diesem Hintergrund sollen in dieser Arbeit das erste Mal akut erkrankte Patient:innen mit Tsutsugamushiefieber aus Nepal mit einer gesunden lokalen Population hinsichtlich der *Orientia*-spezifischen Antikörper- und der inflammatorischen Immunantwort verglichen werden. Ziel ist es, mittels molekularer und serologischer Untersuchungsmethoden, wie PCR und IFAT, im direkten Vergleich von Tsutsugamushiefieber-Patient:innen mit gesunden nepalesischen Blutspender:innen, ein besseres Verständnis von Prävalenz, Diagnostik und Pathogenese der Erkrankung in Nepal zu generieren. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit soll der diagnostische Direktnachweis von *O. tsutsugamushi* mittels PCR sein. Zusätzlich soll der Ausschluss einer Koinfektion mit SFTS-Virus erfolgen. Ein weiteres Ziel dieser Studie ist die Analyse der molekularen Epidemiologie und die Typisierung von *O. tsutsugamushi* in nepalesischen Patient:innen mit Tsutsugamushiefieber.

Durch diese Informationen sollen detailliertere Daten über die Seroprävalenz *Orientia*-spezifischer Antikörper und die Entzündungsantwort in der nepalesischen Bevölkerung, geeignete diagnostische Targets und das Stammvorkommen in Nepal gewonnen werden. Da bislang noch viele Wissenslücken in der systematischen Charakterisierung der molekularen Epidemiologie von *O. tsutsugamushi* in Nepal existieren, könnten diese Daten zu einem klareren Verständnis der Erkrankung und zur Etablierung geeigneter Diagnostik im Land beitragen.

2. Material und Methoden

2.1. Charakteristik der Studiengruppen

Im Zeitraum von April 2016 bis Januar 2017 erfolgte in Nepal an zwei Orten die Sammlung von Serumproben, die von symptomatischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen stammten. Dies fand in Kooperation mit dem *Kathmandu Research Institute for Biological Science* (KRIBS) in Kathmandu, Nepal unter der Leitung von Anurag Adhikari statt.

Die symptomatischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen wurden bereits in Nepal mit einem Schnelltest auf *Orientia*-spezifische IgM-Antikörper untersucht. Der dafür verwendete Schnelltest war der Rapid Diagnostic Test für *Orientia*-IgM (InBios International Inc., Seattle WA, USA). Mittels lateraler Flussimmunchromatographie wurden 10 µl Serum pro Teststreifen auf IgM-Antikörper gegen *O. tsutsugamushi* getestet. Bei dem im Schnelltest genutzten Antigen handelt es sich um eine Mischung rekombinanter 56kD Proteine der vier *Orientia*-Stämme Karp, Kato, Gilliam und TA716.

Es wurden an zwei Orten in unterschiedlichen Regionen Nepals Proben akquiriert (Abb. 5). Beim Standort 1 handelt es sich um das Bheri Zonal Hospital (Provinz Lumbini) in der Terai-Region in der Nähe der Grenze zu Indien. Standort 2 ist das Dhading District Hospital (Provinz Bagmati) im bergigen Teil Nepals. Im Bheri Zonal Hospital wurden 74 Seren und im Dhading District Hospital 8 Seren von symptomatischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen gesammelt (Tab. 1).

Tab. 1: Orte der Probensammlung in Nepal

Standort 1 Bheri Zonal Hospital	Standort 2 Dhading District Hospital
74 Proben Tsutsugamushifieber-Patient:innen	8 Proben Tsutsugamushifieber-Patient:innen



Abb. 5: Karte Nepals mit den Orten der Probensammlung

Standort 1: Bheri Zonal Hospital (Höhe 152 m, Terai-Region).

Standort 2: Dhading District Hospital (Höhe 609 m, Gebirge).

Natural Earth Datenmaterial, erstellt mit qGIS Open Source Software.

Die 50 Seren für die nepalesische Kontrollgruppe stammten von gesunden Blutspender:innen aus der zentralen Blutbank in Kathmandu, Nepal (Gupta et al. 2016). Als eine weitere Kontrollgruppe fungierten Serumproben von anonymen gesunden Blutspender:innen des Blutspendediensts Springe aus Deutschland. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Markus Eickmann (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Eine Übersicht über alle Studiengruppen ist in Tab. 2 abgebildet. Alle Studienteilnehmenden erklärten sich freiwillig zur Teilnahme bereit, eine schriftliche Einwilligung wurde eingeholt. Positive Ethikvoten der zuständigen nepalesischen Behörde *Nepal Health Research Council* (no. 292/2015) sowie der deutschen Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg liegen vor (AZ. Studie 23/21).

Tab. 2: Studiengruppen

	Nepalesische Fallgruppe	Nepalesische Kontrollgruppe	Deutsche Kontrollgruppe
	n=82	n=50	n=43
Charakteristik	Symptomatische Tsutsugamushifieber-Patient:innen, IgM-Schnelltest positiv	Gesunde Blutspender:innen	Gesunde Blutspender:innen

Die Seren waren an den nepalesischen Studienorten bei -20°C gelagert. Der Transport nach Marburg fand im Mai 2017 auf Trockeneis statt. Die Proben wurden anschließend durchgängig bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben (5 min, $1000\times g$) zentrifugiert. Danach erfolgte die Aufteilung der Proben in Aliquots (Teilproben) mit anschließender Lagerung entsprechend der geplanten Verwendung. Dabei stellten sich unterschiedliche tatsächliche Probenvolumina heraus. Durchschnittlich lag eine Probenmenge von $400\ \mu\text{l}$ vor. Für die geplante Durchführung aller Untersuchungen, war eine Menge von $200\ \mu\text{l}$ nötig. Die Anzahl der Proben, die für die jeweiligen Untersuchungen verwendet wurden, ist im Einzelnen im Ergebnisteil aufgeführt.

2.1.1. Erhebung klinischer Daten und Risikofaktoren

Zur Feststellung der klinischen Symptomatik und zur Erhebung anamnestischer Risikofaktoren der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen fand die Ermittlung von klinischen Daten mittels Fragebogen und klinischer Untersuchung statt. Dazu gehörten die Abfrage der Parameter Hitze- und Kältegefühl; Gliederschmerz; Kopfschmerz; Dyspepsie; Übelkeit; Erbrechen; Bauchschmerz; Diarrhoe sowie Tierkontakt in den letzten 30 Tagen und Aktivität im Freien.

Die Befunde Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$, oral); Tachykardie (Herzfrequenz $>100/\text{min}$); Untergewicht; Ikterus; Knistern (Lunge); Hepatomegalie; eine generalisierte Lymphadenopathie; regionale Lymphadenopathien am Hals; der Axilla; sowie der Leiste und der pathognomonische Eschar wurden in der klinischen Untersuchung erhoben.

2.1.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mittels dem Open Source Analyse Programm R (Process and Statistics, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich) und der Software Prism (GraphPad Software, San Diego, USA).

Der Fishers-Exakt-Test wurde für die Unabhängigkeitstestung von 2 Gruppen bei kleinem Stichprobenumfang verwendet. In dieser Arbeit wurde mithilfe dieses Tests u.a. die Abhängigkeit des individuellen Antikörperstatus der Fall- und Kontrollgruppen vom PCR-Ergebnis untersucht.

Der Chi-Quadrat-Test wurde genutzt, um zu prüfen, ob die Verteilung von einem Merkmal in 2 Gruppen identisch bzw. unabhängig ist. Eine Yates-Korrektur fand bei einer Häufigkeit von einem Merkmal <5 statt. In dieser Arbeit wurden mithilfe dieses Tests die Häufigkeitsverteilungen der Antikörpertiterhöhen in den nepalesischen Studiengruppen verglichen.

Der Wilcoxon-Rangsummentest für zwei unabhängige Stichproben wurde verwendet, um Unterschiede zwischen erhobenen Werten aus zwei Populationen zu detektieren. Beispielsweise konnten so gemessene Zytokinkonzentrationen in Fall- und Kontrollgruppen miteinander verglichen werden, ohne dass von einer Normalverteilung der erhobenen Werte ausgegangen werden musste.

Bei allen Testarten wurden p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant gewertet.

Mithilfe einer Vierfelderkontingenztafel wurde die Sensitivität und die Spezifität der 16S qPCR berechnet. Dabei beschreibt die Sensitivität, bei welchem Prozentsatz erkrankter Patient:innen, diese tatsächlich als krank erkannt werden. Sie berechnet sich aus der Anzahl der erkrankten Patient:innen mit positivem Testnachweis geteilt durch die Anzahl aller erkrankten Patient:innen. Je höher die Sensitivität ist, desto sicherer erfasst die PCR die Erkrankten. Die Spezifität sagt aus, mit welchem Prozentsatz die Gesunden wirklich als gesund erkannt werden. Die Berechnung erfolgt aus dem Quotient der richtig als gesund Erkannten und der Gesamtzahl der tatsächlich Gesunden.

2.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Es wurden die Seren der zuvor mittels Schnelltest positiv getesteten Tsutsugamushifieber-Patient:innen, sowie die Proben der nepalesischen und deutschen Kontrollgruppen auf Objektträgern mittels IFAT auf IgM- und IgG-Antikörper gegen *O. tsutsugamushi* untersucht.

2.2.1. Objektträger

Die Objektträger waren mit *O. tsutsugamushi* vom Karp Stamm infizierten murinen L929-Fibroblasten (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) beschichtet und fixiert. Die Objektträger wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Dennis Tappe vom Bernhard-Nocht-Institut (BNI) für Tropenmedizin in Hamburg zur Verfügung

gestellt. Bei diesen handelte es sich dabei um Objektträger aus der Routinediagnostik von 2014. Die Proben der nepalesischen Fallgruppe, bei denen sich kein IgM gegen *Orientia* vom Karp Stamm finden ließ, wurden erneut mittels IFAT getestet. Dabei wurden Objektträger der Routinediagnostik von 2009 verwendet, die mit Fibroblasten beschichtet waren, die mit *O. tsutsugamushi* vom Kato und Sido Stamm infiziert waren. Diese wurden ebenfalls durch Prof. Dr. Dennis Tappe (BNI) zur Verfügung gestellt.

2.2.2. Indirekter Immunfluoreszenz Antikörper Test

Für die Verdünnung der Serumproben wurde ein 3%-iger Milchpulverpuffer verwendet: 0,75 g Milchpulver (Saliter, Obergünzburg, Deutschland) in 25 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄ in Wasser). In seriellen (1:4) Verdünnungsstufen von 1:20 bis 1:320 für die IgM-Antikörpertestung und 1:80 bis 1:5120 für die IgG-Antikörpertestung wurden je 20 µl der Serumverdünnungen auf den Wells der Objektträger (ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland) aufgetragen. Als Positivkontrolle diente eine humane Serumprobe mit einem zuvor bestimmten Titer von 1:1280 für IgG- und 1:80 für IgM-Antikörper, als Negativkontrolle in der Verdünnungsstufe 1:80 diente ein auf HIV, Hepatitis B und C negativ getestetes Serum der virologischen Routinediagnostik des Universitätsklinikums Marburg. Bei den IgM-Testungen mit Kato- und Sido-Objektträgern fungierte eine positiv auf IgM gegen Karp, Kato und Sido getestete Probe mit einem Titer von 1:20 aus der Phase der Etablierung als Positivkontrolle. Dann erfolgte die Inkubation bei 37°C für 30 min in einer feuchten Kammer, eine kleine Kunststoffbox mit Flüssigkeitsfilm, die eine Verdunstung der aufgetragenen Proben verhindert. Nach dem Waschen (3x) mit PBS in einer Glasküvette wurden die Proben für 30 min mit dem Sekundärantikörper (s.u.) 15 µl pro Well beschichtet, bei 37°C inkubiert, anschließend 3x alle 5 min gewaschen, getrocknet, mit PBS eingedeckelt (Deckgläschen, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und bei 4°C dunkel gelagert. Die Auswertung der Immunreaktion sowie die Dokumentation inklusive digitaler Kamera erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskop (Axiophot, Zeiss, Jena, Deutschland) und der VisiView Software (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland). Es wurde ein Objektiv in 20-facher Vergrößerung verwendet. Eine Probe wurde positiv gewertet, wenn eine *Orientia*-spezifische

grüne Fluoreszenz in mindestens 50% der infizierten Zellen zu erkennen war. Als IgM-positiv wurden Proben gewertet bei einem Titer von $\geq 1:20$ und als IgG-positiv bei einem Titer von $\geq 1:80$. Der Endpunkt wurde bei dem höchsten Titer mit noch spezifischer Fluoreszenz durch 2 Untersuchende – doppel-blind im Vier-Augen-Prinzip – bestimmt (Kingston et al. 2015). Zwischentiter wurden vergeben, wenn sich eine Proben-Fluoreszenz zwischen zwei Titerstufen befand. Zusätzlich wurde die Zuordnung der Proben zu den Objektträgern randomisiert.

2.2.3. Sekundärantikörper

Die mit Alexa-Fluor 488-Farbstoff konjugierten Sekundärantikörper aus dem Wirtstier Ziege zur Detektion humaner IgM- und IgG-Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (Tab. 3) in PBS und Evans Blau Farbstoff 1% (1:500) (Sigma-Aldrich), zur Gegenfärbung in rot und Maskierung unspezifischer Fluoreszenzen, angesetzt. Die Wahl der Konjugatverdünnungen erfolgte anhand der spezifischsten Fluoreszenz von *Orientia*-Antikörper positiven Proben im Vergleich mit Hintergrundfluoreszenzen von HIV, Hepatitis B und C negativ getesteten Seren. Dabei war das Ziel – mit einem durch das BNI eingeführten Cut-off Antikörpertiter von $\geq 1:80$ – die maximale Sensitivität für die Detektion der Antikörper positiven Seren, ohne unspezifische Fluoreszenz der negativen Seren, zu erreichen.

Tab. 3: Charakteristika der Sekundärantikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herstellende Firma
Anti-Human-IgM, Fc(5 μ) Alexa 488 konjugiert	Ziege, polyklonal	1:150	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Human-IgG, Fc(γ) Alexa 488 konjugiert	Ziege, polyklonal	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.3. Nachweis von *O. tsutsugamushi* mittels PCR

2.3.1. Isolierung der Gesamt-Nukleinsäure

Die Gesamt-Nukleinsäure (RNA und DNA) wurde aus allen Proben mittels EZ1 Virus Mini Kit v2.0 mit der EZ1 Virus Card v2.0 im EZ1 Advanced XL (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert. Dabei handelte es sich um eine halbautomatisierte Aufreinigung. Die Serumproben wurden vor der Aufreinigung mit 350 µl PBS verdünnt, die dabei verwendete Probenmenge betrug 50 µl (Verhältnis 1:8). Als Elutionspuffer wurde AVE Puffer 60 µl verwendet, die Menge der Carrier RNA betrug 3,6 µl (beides Qiagen). Das in die Extraktion eingesetzte Gesamtvolumen betrug 400 µl, die Elution erfolgte in 60 µl. Die DNA-Aufreinigungen wurden direkt als dreifache Probenreplikate (n=3) in die PCR eingesetzt oder wurden bei 4°C maximal einen Monat gelagert.

2.3.2. Nachweis von *O. tsutsugamushi*: 16S qPCR

Um *Orientia*-spezifische 16S DNA in den nepalesischen Proben direkt nachzuweisen, wurde das 16S real time qPCR Protokoll von Sonthayanon et al. als Grundlage verwendet, die 16S-Sequenz hat eine Länge von 151 bp (Sonthayanon et al. 2009). Die Amplifizierung der *Orientia*-spezifischen 16S DNA mittels 16S rt qPCR erfolgte im LightCycler™ 480 (Roche, Mannheim, Deutschland). Zusätzlich wurde zur Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Extraktion sowie zur Feststellung von möglichen PCR Inhibitoren die 16S rt qPCR nach Sonthayanon et al. um das Gen der humanen Ribonuklease P (RNaseP) als interne Kontrolle erweitert (Emery et al. 2004). Ein Fragment der humanen RNaseP-Sequenz (65bp) (Emery et al. 2004) wurde in den pCR™2.1-TOPO®-Vektor (Invitrogen, ThermoFisher) kloniert, das Plasmid wurde bei der PCR in einer 10⁻⁹ Verdünnung als Positivkontrolle mitgeführt. Die RNaseP-Sequenz wurde im Multiplex-Verfahren parallel zu 16S amplifiziert und mit einer Cy5-markierten Sonde im Cy5-Kanal (618-660) detektiert. Die Auswertung der 16S rt qPCR fand mittels Kammfilter 465-510 im FAM-Kanal (16S-Sonde) statt. Es wurde der Modus absolute Quantifizierung, Maximum der 2. Ableitung und hohe Konfidenz verwendet.

Für die Multiplex rt qPCR wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 15 µl hergestellt, dem 5 µl Probeneluat hinzugefügt wurde. Der Mastermix - dessen Konzentrationen zuvor austitriert worden waren - beinhaltete 4 µl LightCycler Multiplex DNA Master 5x mit AptaTaq Fast DNA Polymerase (Roche), 8,8 µl H₂O (Roche), je 0,2 µl *forward* und *reverse* RNaseP-Primer und Sonde (20 µM, Biomers, Ulm, Deutschland), sowie je 0,6 µl 16S *forward* und *reverse* Primer (20 µM, Biomers) und 0,4 µl OT-16S-Sonde (10 µM, Biomers) (s.u. 5.3.6. Primer und Sonden (Tab. 8)). Der Reaktionsmix mit dem Endvolumen von 20 µl wurde in einer 96 Well-Platte (Roche) im LightCycler 480 für 2 min auf 95°C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren (Tab. 4). Die Amplifikation fand in 50 Zyklen statt: Bei 95°C wurden die DNA-Doppelstränge für 10 s denaturiert. Bei einer Annealingtemperatur von 56°C hybridisierten für 45 s die Primer mit ihrer spezifischen Zielstruktur der DNA-Einzelstränge, es folgte die Polymerisierung an der DNA-Matrize mit Nukleotiden durch die Polymerase mit finaler Elongation. Am Ende wurde das PCR-Produkt auf 4°C heruntergekühlt. Als Standard wurde ein 16S-Standard (Plasmid-Standard) in einer Verdünnung von 10⁻⁶ entsprechend 53.000 Kopien/ 5 µl zur Quantifizierung in jedem Lauf mitgeführt. Eine Negativkontrolle wurde mit 5 µl H₂O anstelle von Probeneluat für jede PCR durchgeführt.

Tab. 4: Temperaturprofil der 16S qPCR (Sonthayanon et al. 2009)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	10 s	50
Annealing und Elongation	56°C	45 s	50
Kühlung	4°C		

Die Etablierung der 16S Standardkurve erfolgte mittels eines die 16S Sequenz enthaltenden Plasmids, das im Labor der AG Keller durch Dr. Zacharias Orfanos freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Das Plasmid aus dem pCR™2.1-TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen, ThermoFisher) hat eine Gesamtlänge von 4088 bp. Die Plasmidkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch mittels Nanodrop ND 1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Sie lag bei 6 verschiedenen Messungen bei einem Mittelwert von 47,52 ng/ µl. Bei einer Länge von 151 bp des 16S Inserts und einer Avogadrozahl von $1,096 \cdot 10^{21}$ entspricht dies der Anzahl von $10606 \cdot 10^6$ 16S Kopien/ µl. Für die Etablierung der Standardkurve und zur Testung der Sensitivität mittels Probit Analyse wurden Verdünnungsstufen von 10^{-4} bis $10^{-11,5}$ entsprechend $53 \cdot 10^5$ -0,167 16S Kopien/ 5 µl verwendet. Die Amplifikationskurven der Verdünnungsreihen des 16S-Plasmidstandards sind in Abb. 6 dargestellt.

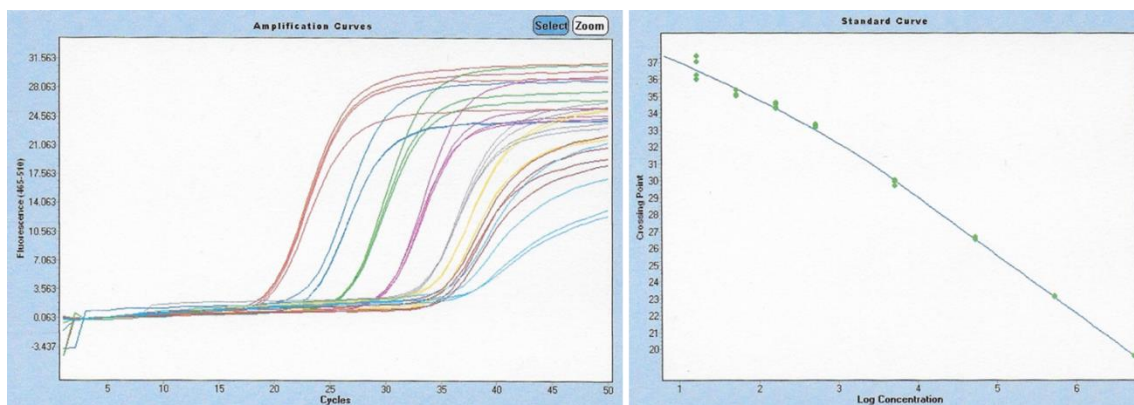


Abb. 6: Amplifikationskurven des *Orientia* 16S Standards und Standardkurve
 Testung des 16S Plasmid-Standards in 3 Replikaten im LightCycler™ 480 (Roche).
 Verdünnungsstufen des Standards 10^{-4} bis $10^{-9,5}$ (Effizienz: 1,948, Steigung: -3,452).

Es ließ sich zudem keine Inhibition der 16S rt qPCR feststellen. Mit der somit neu eingeführten *Orientia* 16S-spezifischen multiplex real time qPCR konnte der direkte *O. tsutsugamushi*-Nachweis in den nepalesischen Proben erfolgreich durchgeführt werden.

2.3.3. Nachweis von *O. tsutsugamushi*: 47kD qPCR

Die zuvor *Orientia* 16S qPCR positiv getesteten Proben der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe wurden erneut amplifiziert, mit der Fragestellung, ob sich die 16S qPCR Ergebnisse mithilfe einer weiteren unabhängigen molekularen Zielsequenz - dem *Orientia*-spezifischen 47kD Membranproteingen - bestätigen lassen. Dafür wurde die 47kD real time qPCR nach Jiang et al. verwendet (Jiang et al. 2004). Es wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l (je zu testender Probe) hergestellt, dem 5 μ l Probeneluat hinzugefügt (Reaktionsvolumen 25 μ l) wurden. Der Mastermix beinhaltete 13,15 μ l H₂O, 2,5 μ l 5 mM MgCl₂-Puffer (50 mM, Invitrogen), 2,5 μ l 10x-Platinum-Puffer (Invitrogen), 0,5 μ l dNTP (10 mM, Invitrogen) sowie je 0,5 μ l *forward* und *reverse* Primer (20 μ M, Biomers), 0,25 μ l OT47kD Probe (10 μ M, Biomers) (s.u. 5.3.6. Primer und Sonden (Tab. 8)) und 0,1 μ l PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen, ThermoFisher). Das Reaktionsgemisch mit dem Endvolumen von 25 μ l je Probe wurde in einer 96 Well-Platte (Roche) im LightCycler 480 nach dem in Tab. 5 beschriebenen PCR-Protokoll amplifiziert. Eine Negativkontrolle wurde mit 5 μ l H₂O anstelle von Probeneluat für jede PCR durchgeführt. Als qualitative Positivkontrolle wurde genomische *Orientia* Karp-DNA in einer Verdünnung von 10⁻³ Kopien/ 5 μ l verwendet.

Tab. 5: Temperaturprofil der 47kD qPCR (Jiang et al. 2004)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	10 s	50
Annealing und Elongation	60°C	30 s	50
Kühlung	4°C		

2.3.4. Nachweis von *O. tsutsugamushi*: 56kD PCR

Die 16S rt qPCR positiv getesteten Proben der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe wurden in der 56kD PCR nach Mahajan et al. amplifiziert mit dem Ziel der anschließenden Sequenzierung (Mahajan et al. 2006). Die Primer nach Mahajan et al. umschließen die VD I. Nach Ohashi et al. wird diese mit der Position 105-133 Aminosäuren angegeben. Dies entspricht 315-399 Basenpaaren (Ohashi et al. 1992a). Das 56kD PCR Produkt hat eine Basenpaarlänge von insgesamt 407 bp (Abb. 7).

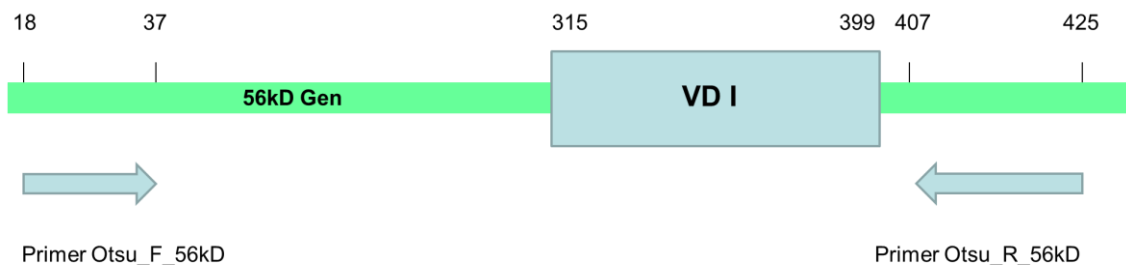


Abb. 7: Primerbindungsstellen der 56kD PCR

Nach Mahajan et al. umschließen die Primer die variable Domäne (VD) I an der Position 315-399 des *open reading frame*. *Forward* Primer Position 18-37, *reverse* Primer Position 407-425.

Die Amplifizierung des 56kD Genfragments mittels PCR erfolgte im GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Waltham, USA). Es wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, dem 5 µl Probeneluat hinzugefügt wurde. Der Mastermix beinhaltete 15,85 µl H₂O, 2,5 µl 10x-HotStarTaq-Puffer (Qiagen), 0,5 µl dNTP (10 mM, Qiagen) sowie je 0,6 µl *forward* und *reverse* Primer (10 µM, Biomers) (s.u. 5.3.6. Primer und Sonden (Tab. 8)) und 0,15 µl HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen). Der HotStarTaq-Puffer enthält bereits 1,5 mM MgCl₂. Zusätzlich wurde pro Ansatz 1 µl 2,5 mM MgCl₂-Puffer (25 mM Qiagen) hinzugefügt, da - nach Austestung verschiedener zusätzlicher MgCl₂ Konzentrationen (0 mM-5 mM pro Ansatz) - die PCR damit die größte Sensitivität aufwies. Die Probe mit dem Endvolumen von 25 µl wurde im GeneAmp PCR System 2700 amplifiziert (Tab. 6). Eine Negativkontrolle wurde mit 5 µl H₂O anstelle von Probeneluat für jede PCR durchgeführt. Die sich anschließende Gelelektrophorese und Sequenzierung wird in den folgenden Kapiteln beschrieben.

Tab. 6: Temperaturprofil der 56kD PCR (Mahajan et al. 2006)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Aktivierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	30 s	45
Annealing	57°C	60 s	45
Elongation	72°C	60 s	
	72°C	10 min	
Kühlung	4°C		

2.3.5. Nachweis von SFTS-Virus: RT qPCR

Das Protokoll der real time Reverse Transkriptase (RT) PCR zum Nachweis des SFTS-Virus wurde im Institut für Virologie bereits etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Amplifizierung der SFTS-Virus-RNA (N-Gen (S-Segment), Amplifikatlänge 457 bp) mittels SFTS-Virus qPCR nach Yoshikawa et al. erfolgte im LightCycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) (Yoshikawa et al. 2014). Es wurde ein Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 µl hergestellt, dem 5 µl Probeneluat hinzugefügt wurde. Der Mastermix beinhaltete 10,5 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) H₂O (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen), 5 µl 5x-RT-Puffer (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen), 1 µl dNTP (50mM, OneStep RT-PCR Kit, Qiagen) sowie je 1 µl *forward* und *reverse* Primer (10µM, TIB Molbiol, Berlin, Deutschland), 0,5 µl SFTS-Sonde (10µM, TIB Molbiol) (s.u. 5.3.6. Primer und Sonden (Tab. 8)) und 1 µl Quantitect RT-Mix (Qiagen). Die Reaktionsgemische mit dem Endvolumen von 25 µl wurden in einer 96 Well-Platte im LightCycler 480 amplifiziert (Tab. 7). Dabei fand zuerst der reverse Transkriptase Schritt zur Herstellung der cDNA aus RNA bei 50°C für 30min statt. Als Plasmidstandard wurden Kontrollen in den Konzentrationen 10² bis 10⁵ Kopien/ µl mitgeführt. Als Negativkontrolle diente H₂O. Als Auswertungsmodus wurde der Kammfilter 465-510, die absolute Quantifizierung, Maximum der 2. Ableitung und eine hohe Konfidenz verwendet.

Tab. 7: Temperaturprofil der SFTS qPCR (Yoshikawa et al. 2014)

	Temperatur	Zeit	Zyklen
RT	50°C	30 min	
Aktivierung	95°C	15 min	
Denaturierung	94°C	15 s	45
Annealing und Elongation	60°C	60 s	45
Kühlung	4°C		

2.3.6. Primer und Sonden

Die verwendeten Primer- und Sondensequenzen (Tab. 8) wurden den jeweiligen Publikationen entnommen und wurden hauptsächlich von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) hergestellt, ausgenommen der SFTS-Virus Primer und Sonde (Probe). Diese wurden durch die Firma TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) produziert.

Tab. 8: Übersicht der verwendeten Primer und Sonden

Primer/Sonde (probe)	Sequenz (5'-3')	Amplikon (bp)	Zielstruktur mit Spezies und Quelle
OT3-F for	CCCATCAGTACGGAAT AACA	151	16S <i>O. tsutsugamushi</i> (Sonthayanon et al. 2009)
OT1-R rev	CTCTCAGACCAGCTAC AGATCACA	151	16S
OT16S probe	6FAM- TAAGTGCTAATACCGT ATGCCCTCTA-BHQ1	n.z.	16S
RNaseP for	AGATTTGGACCTGCG AGCG	65	RNaseP <i>Homo sapiens</i> (Emery et al. 2004)
RNaseP rev	GAGCGGCTGTCTCCA CAAGT	65	RNaseP
RNaseP660 probe	Cy5- TTCTGACCTGAAGGCT CTGCGCGT-Q3	n.z.	RNaseP
Otsu_F_56kD for	AATTGCTAGTGCAATG TCTG	407	56kD <i>O. tsutsugamushi</i> (Mahajan et al. 2006)
Otsu_R_56kD rev	GGCATTATAGTAGGCT GAG	407	56kD
OtsuFP630 for	AACTGATTTTATTCAA ACTAATGCTGCT	118	47kD <i>O. tsutsugamushi</i> (Jiang et al. 2004)
OtsuRP747 rev	TATGCCTGAGTAAGAT ACRTGAATRGAATT	118	47kD
OtsuPR665 probe	6FAM- TGGGTAGCTTTGGTG GACCGATGTTTAATCT -BMN530	n.z.	47kD
SFTS for	TGTCAGAGTGGTCCA GGATT	457	N-Gen (S-Segment) SFTS-Virus (Yoshikawa et al. 2014)
SFTS rev	ACCTGTCTCCTTCAGC TTCT	457	N-Gen (S-Segment)
SFTS probe	6FAM- TGGAGTTTGGTGAGC AGCAGC-BHQ1	n.z.	N-Gen (S-Segment)

2.3.7. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung der Amplifikate wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese in einem 1,5%-igen Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel wurde aus 2,25 g Agarosepulver Biozym LE Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) und 150 ml 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, pH 8,3, 242 g Tris Base, 57,1 ml Essigsäure 100%, 100 ml 0,5 M EDTA) hergestellt und dafür erhitzt, gelöst und in eine Gelkammer mit Kamm für die Probenaschen (Clever Scientific, Rugby, UK) gegossen. Vor dem Auspolymerisieren wurde 9 µl GelRed (Geneon, Ludwigshafen, Deutschland) in das noch flüssige Gel eingerührt, das die DNA-Fragmente anfärbt und sie später durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar macht. Nach dem Polymerisieren wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer bedeckt. Durch einen Ladepuffer konnte das Durchlaufen der Proben durch das Agarosegel verfolgt werden. Hierzu wurden 1,6 µl farbiger Ladepuffer (6X TriTrack DNA Loading Dye, ThermoFisher) mit 8 µl PCR-Produkt vermischt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Bei einer angelegten Spannung von 110-120 Volt für ca. 60min trennten sich die DNA-Fragmente der PCR-Produkte mit Ladepuffer nach ihrer Größe auf. Ein standardisierter DNA-Marker (20.000bp GeneRuler 1kb DNA-Ladder Plus, ThermoFisher) lief zum Vergleich der Größe der DNA-Fragmente in der ersten Spur mit. Mittels UV-Licht wurde mit dem Geldokumentationssystem GelStick Touch (Intas, Göttingen, Deutschland) ein digitales Bild gemacht.

2.3.8. Sequenzierung nach Sanger

Es wurden die positiv in der 16S PCR getesteten Amplifikate aus der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe sequenziert. Ebenso wurden die *Orientia* 56kD PCR positiven Proben sequenziert. Die Sanger-Sequenzierung der PCR-Amplifikate erfolgte über den kommerziellen Anbieter SeqLab Microsynth GmbH, Göttingen, Deutschland. Je 2 Tubes pro Produkt, Gesamtvolumen je 15 µl mit ca. 40-100 ng/ µl, wurden verschickt. Ein Tube enthielt 3 µl *forward* oder *reverse* Primer (10 mM) mit 9 µl H₂O und 3 µl des PCR-Produkts. Die Sequenzierung erfolgte direkt aus dem PCR-Produkt, ohne vorherige Aufreinigung. Die anschließend erhaltenen partiellen bidirektionalen 56kD Sequenzen wurden in der Geneious-Software (Version 11.1.5)

zusammengefügt und, nach Trimmung der Primerbindungsstellen, über das BLAST-Tool (Basic Local Alignment Search Tool) mit anderen in der NCBI-Gendatenbank hinterlegten Sequenzen verglichen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mit den am nächsten verwandten Sequenzen sowie der einiger Prototyp-Stämme wurde mit Hilfe der BioEdit-Software (Version 7.0.5.3) ein Multiple Alignment (ClustalW) der neuen sowie der heruntergeladenen publizierten Sequenzen erstellt. Die Datei dieses Alignments wurde in der Geneious-Software geöffnet und in dieser - unter Verwendung der Maximum Likelihood-Methode auf Basis des Tamura-Nei-Modells - ein phylogenetischer Stammbaum erstellt.

2.4. Messung von Zytokinkonzentrationen mittels Multiplex-Immunoassay

Für die Messung der Zytokinkonzentrationen in den Serumproben der Studiengruppen, wurde ein Bead-basiertes Multiplex-Immunoassay ausgewählt. Verwendet wurde das LEGENDplex™ Human Th Cytokine Panel (13-plex) (Biolegend, London, UK) nach Herstellerprotokoll. Die Zytokinbestimmungen wurden mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) im Zentrum für Tumorbologie und Immunologie (ZTI) mit Hilfe der AG Brendel durchgeführt. Folgende Zytokine wurden für die Auswertung ausgewählt: IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α . Das Prinzip der gleichzeitigen Konzentrationsmessung der inflammatorischen Marker im Bead-basierten Immunoassay ist in Abb. 8 dargestellt.

Eine Standardreihe (Verdünnung 1:4) wurde mit Hilfe des am höchsten konzentrierten Standards des Zytokin-Panels etabliert und bei jeder Messung in Duplikaten mitgeführt. Jedes Zytokin hatte dabei eine höchste Standardkonzentration von 10.000 pg/ ml und eine niedrigste von 2,44 pg/ ml. Die Konzentration jedes gemessenen Zytokins wurde in jeder Probe gemäß der Standardkurve ermittelt. Die Messung der fluoreszierenden Signale, deren Intensität proportional zur Menge der gebundenen Zytokine ist, erfolgte am Durchflusszytometer BD™ LSR II (BD Biosciences). Für die Aufnahme wurde die BD FACSDiva™ Software verwendet. Bei 3 Probenreplikaten wurde der Mittelwert für die Auswertung gebildet, die mit der speziell von Biolegend für die Auswertung bereitgestellten LEGENDplex™ Daten Analyse Software erfolgte.

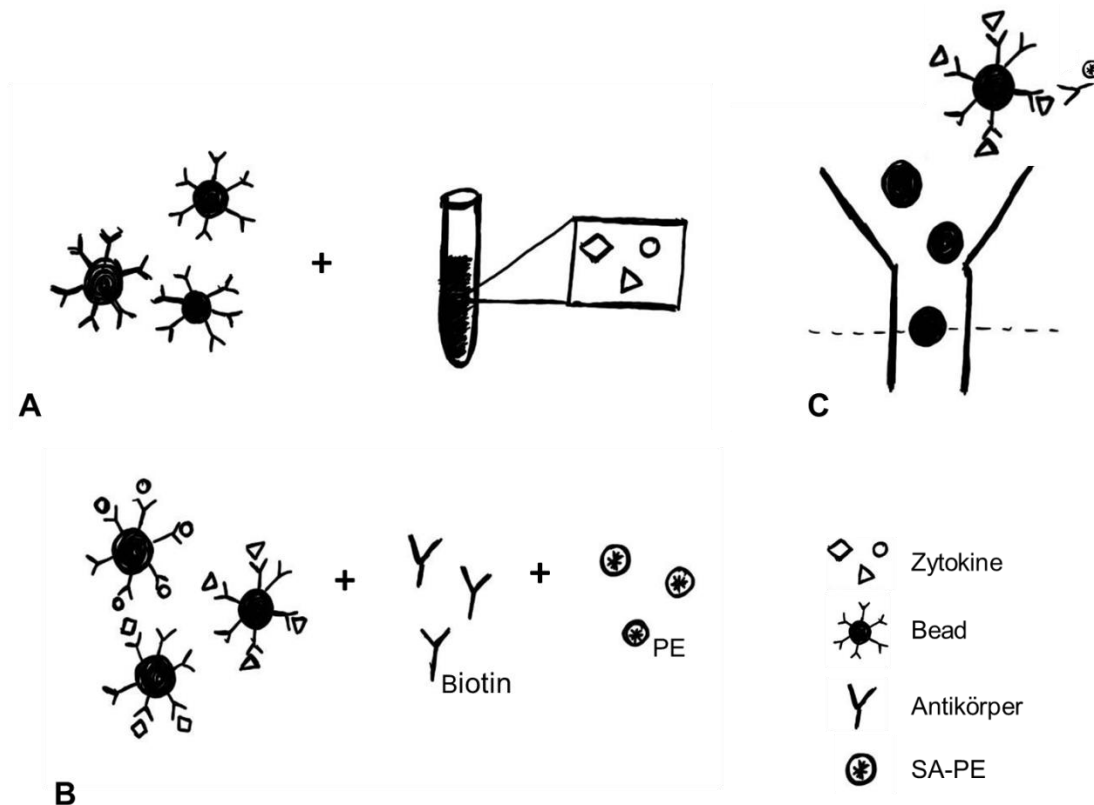


Abb. 8: Prinzip des Immunoassays zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen

A: Zytokin spezifische Beads mit in Serumprobe enthaltenen Zytokinen.

B: An Beads gebundene Zytokine mit biotinylierten Detektionsantikörper Y und SA-PE.

C: Gebundene Detektionsantikörper mit gebundenem SA-PE. Messung der Zytokinkonzentration anhand der Intensität des Fluoreszenzsignals mittels FACS an der gestrichelten Linie. Abbildung modifiziert nach Hersteller.

Für den Ansatz von 3 Probenreplikaten wurden je 12,5 µl Probenvolumen, 12,5 µl Beads (Biolegend) und 26 µl Assay Puffer (Biolegend) pro Well in einer Polypropylen 96 Well V-Boden Platte (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Inkubation auf dem Schüttler (Stärke 5) erfolgte für 2,5 h bei Raumtemperatur. Danach fand ebenfalls bei Raumtemperatur und unter Schutz vor Lichteinstrahlung, die Inkubation auf dem Schüttler (Stärke 5) mit je 12,5 µl biotinyliertem Detektionsantikörper und SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin) für 30 min statt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000xg wurde der Überstand entfernt. Anschließend wurden insgesamt 3 Waschschrte mit pro Well je 200 µl Waschpuffer (Biolegend), eine Zentrifugation für 5 min bei 1000xg und eine Entfernung des Überstandes durchgeführt. Beim letzten Durchgang verblieb der Waschpuffer im Well. Die Proben wurden dann mit 200 µl PBS in transparente Polystyrol FACS Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und gemessen (s.o.).

3. Ergebnisse

3.1. Prävalenz *Orientia*-spezifischer Antikörper bei nepalesischen Patient:innen mit Tsutsugamushifieber

3.1.1. *Orientia*-spezifisches IgM bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen

Um den IgM-Schnelltest-Nachweis gegen *O. tsutsugamushi* mittels des Goldstandardverfahrens der IFAT zu bestätigen, wurden zunächst die Seren der nepalesischen Fallgruppe (n=82) auf IgM-Antikörper gegen den häufigsten *Orientia*-Stamm Karp untersucht (Abb. 9). Gleichzeitig wurden mit demselben Verfahren 50 Seren nepalesischer Blutspender:innen auf *Orientia*-spezifisches IgM untersucht. Bei 26 der 82 (32%) Seren der nepalesischen Fallgruppe wurden mittels IFAT IgM-Antikörper mit einem Titer von $\geq 1:20$ bis $\geq 1:320$ gegen *Orientia* Karp nachgewiesen (Abb. 10). Um die verbleibenden 56 Seren, die im Karp-IgM-Test negative Ergebnisse hatten, auf eine mögliche IgM-Immunantwort gegen Antigene anderer *Orientia*-Stämme zu untersuchen, wurden diese auf *Orientia* Sido- und Kato-spezifische IgM-Antikörper ebenfalls mittels IFAT getestet. Bei 9 dieser 56 Proben ließen sich *Orientia* Sido-spezifische IgM-Antikörper und bei 3 weiteren Proben *Orientia* Kato-spezifische IgM-Antikörper finden (Abb. 9). Bei insgesamt 38 von 82 (46%) Seren konnte mittels IFAT ein IgM-Nachweis gegen einen der drei Stämme erbracht werden, während 44 der 82 Seren (54%) im IFAT negative IgM-Ergebnisse zeigten. Von den 50 Seren nepalesischer Blutspender:innen wiesen 2 (4%) Proben *Orientia* Karp-spezifisches IgM mit einem Titer von 1:20 auf (Abb. 10). Damit konnten mittels IFAT bei 38 von 82 Proben die IgM-Schnelltestergebnisse für IgM-Antikörper gegen *Orientia* Karp und Kato bestätigt und um Sido erweitert werden, denn bei den zuvor im Schnelltest genutzten Antigenen handelte es sich um das rekombinante 56kD Protein der *Orientia*-Stämme Karp und Kato. Die Reaktivität mit Antigenen der beiden weiteren im Schnelltest enthaltenen *Orientia*-Stämme Gilliam und TA716 konnte mangels Verfügbarkeit entsprechend beschichteter Objektträger nicht überprüft werden.

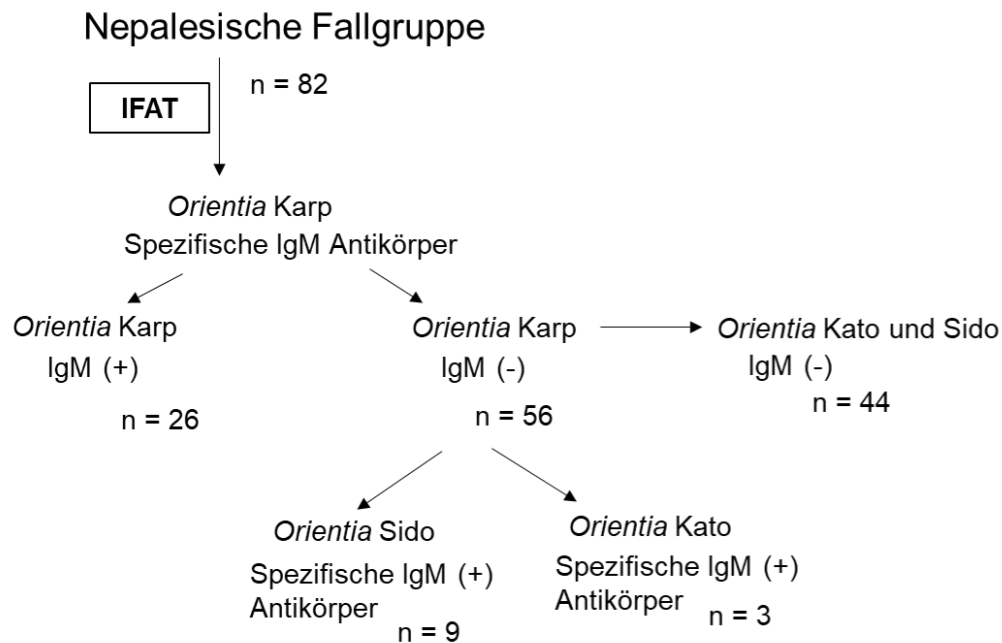


Abb. 9: Fließschema der IFAT für *Orientia*-spezifische IgM-Antikörper-Nachweise

Zur Bestätigung der IgM-Schnelltestergebnisse wurde auf *Orientia* Karp IgM-Antikörper und anschließend auf Kato und Sido IgM-Antikörper getestet.

Weiterhin wurden die Anteile der *Orientia*-spezifischen Karp IgM-Antikörper-Nachweise der Fallgruppe und der nepalesischen Blutspender:innen verglichen (Abb. 10). Dies fand mittels Fishers-Exakt-Test statt, dabei wurde ein p-Wert $<0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Bei einem p-Wert $<0,05$ zeigt sich ein signifikanter Unterschied im *Orientia*-spezifischem Karp IgM zwischen der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe.

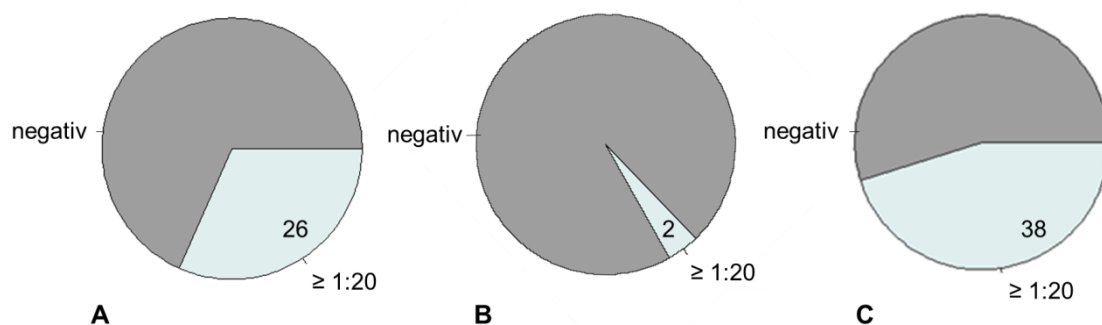


Abb. 10: *Orientia*-spezifisches IgM bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen

A: Anteil anti-Karp-IgM-positiver Proben in der nepalesischen Fallgruppe (26/82, 32%).
 B: Anteil anti-Karp-IgM-positiver Proben bei nepalesischen Blutspender:innen (2/50, 4%).
 Die Anteile (A und B) unterscheiden sich signifikant, $p < 0,05$ mittels Fishers-Exakt-Test.
 C: Anteil IgM-positiver Proben gegen *Orientia*-Stämme Karp, Sido und Kato in der nepalesischen Fallgruppe, kumuliert (38/82, 46%).
 Blau: IgM-positive Proben mit einem Titer $\geq 1:20$. Grau: Negativ getestete Seren.

Die Häufigkeitsverteilung ist in Abb. 11 gezeigt. In der nepalesischen Fallgruppe (n=82) fanden sich unter den positiv getesteten Seren IgM-Titer von $\geq 1:20$ bis $\geq 1:320$. Darunter hatten 14,6% (n=12) einen Titer von $\geq 1:320$. Alle 12 Seren mit negativen IgM-Ergebnissen im IFAT gegen den Karp-Stamm, die aber einen *Orientia* Sido- und Kato-spezifischen IgM-Antikörpernachweis zeigten, wiesen eine Titerhöhe von 1:20 auf. Die IgM-positiven Seren aus der Gruppe der nepalesischen Blutspender:innen (n=2) zeigten einen Titer von 1:20. Es wurden signifikant höhere IgM-Antikörpertiter in den Tsutsugamushifieber-Patient:innen gefunden im Vergleich zu den nepalesischen Blutspender:innen ($p=0,044$ im Chi-Quadrat-Test).

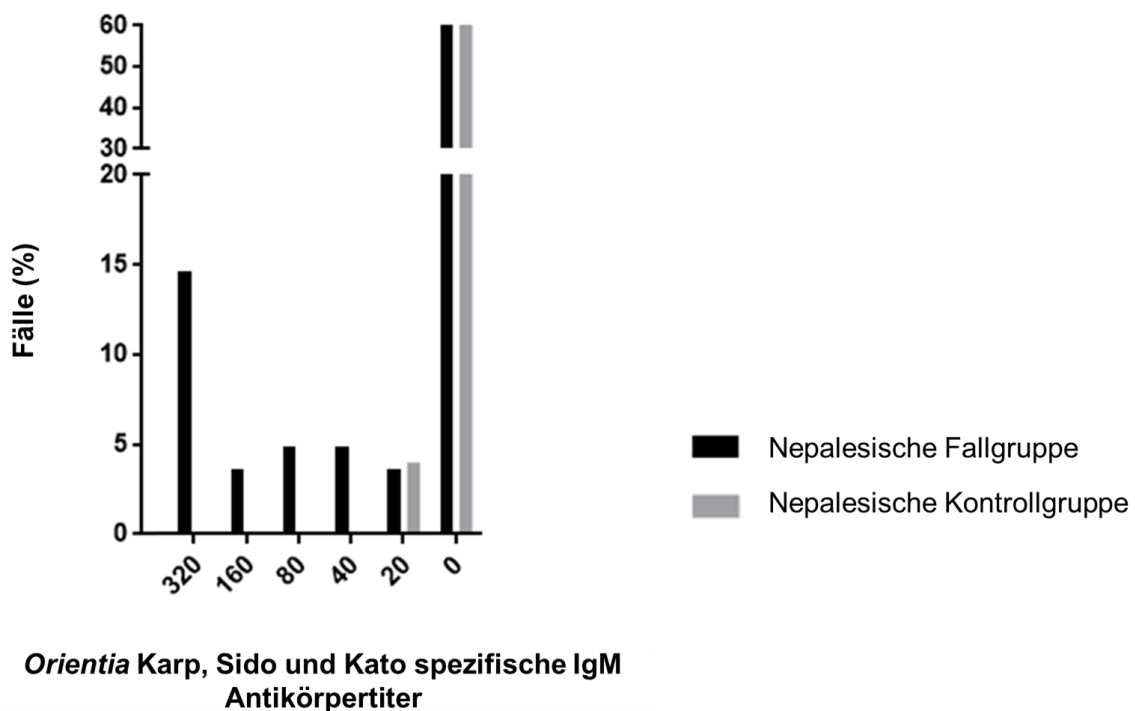


Abb. 11: Normalisierte Häufigkeitsverteilung der *Orientia*-spezifischen IgM-Titer

Für jede Titerstufe von $\leq 1:20$ bis $\geq 1:320$ wurde der relative Anteil an Proben aufgetragen, die positiv für IgM gegen *Orientia* Karp, Sido, Kato getestet wurden. Nepalesische Fallgruppe: Im IgM-Schnelltest positiv getestete Patient:innen mit akuter Fiebererkrankung. Nepalesische Kontrollgruppe: Asymptomatische Blutspender:innen. Die Titerhöhen unterscheiden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen, $p=0,044$ (Chi-Quadrat-Test).

3.1.2. *Orientia*-spezifisches IgG bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen

Um die Prävalenz *Orientia*-spezifischer IgG-Antikörper in den drei Studiengruppen zu bestimmen, wurden alle Seren der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe, sowie der deutschen Kontrollgruppe mittels IFAT auf IgG-Antikörper gegen den häufigsten *Orientia*-Stamm Karp untersucht. In Abb. 12 ist ein Immunfluoreszenzbild der IgG-Positivkontrolle gezeigt. In 53 von 82 (65%) Seren der nepalesischen Fallgruppe wurde ein positiver IgG-Antikörpernachweis gegen *O. tsutsugamushi* Karp erbracht. In der nepalesischen Kontrollgruppe (Blutspender:innen) wurden in 26 Seren von 50 (52%) getesteten Seren *Orientia* Karp-spezifische IgG-Antikörper detektiert (Abb. 13). In der deutschen Kontrollgruppe (n=43) wurden keine *Orientia* Karp-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Damit fand sich in beiden nepalesischen Gruppen ein ähnlich hoher Anteil an Proben mit *Orientia*-spezifischen IgG-Antikörpertitern (Abb. 13).

Der geringe Unterschied des Anteils IgG-positiver Seren zwischen der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe war nicht signifikant, $p > 0,05$, Fishers-Exakt-Test. Die deutsche Kontrollgruppe unterscheidet sich dagegen signifikant von den beiden nepalesischen Studiengruppen ($p < 0,05$).

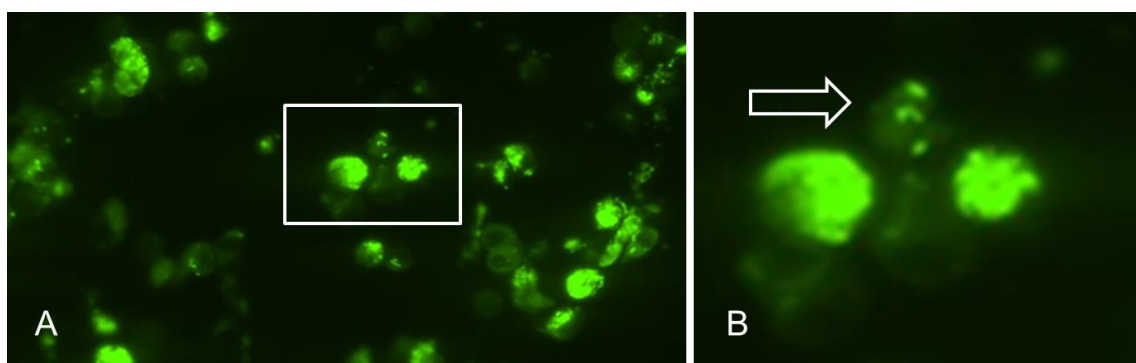


Abb. 12: Indirekte Immunfluoreszenz (*Orientia* Karp IgG)

Orientia IgG-Positivkontrolle im 20er Objektiv. A: *O. tsutsugamushi* infizierte L929 Fibroblasten nach Inkubation mit einem humanen Antiserum 1:1280 und FITC-konjugiertem Sekundärantikörper, Übersicht. B: Ausschnitt und Vergrößerung der infizierten Zellen mit positiver Fluoreszenz im Zytoplasma und Zellmembranbereich (Pfeil).

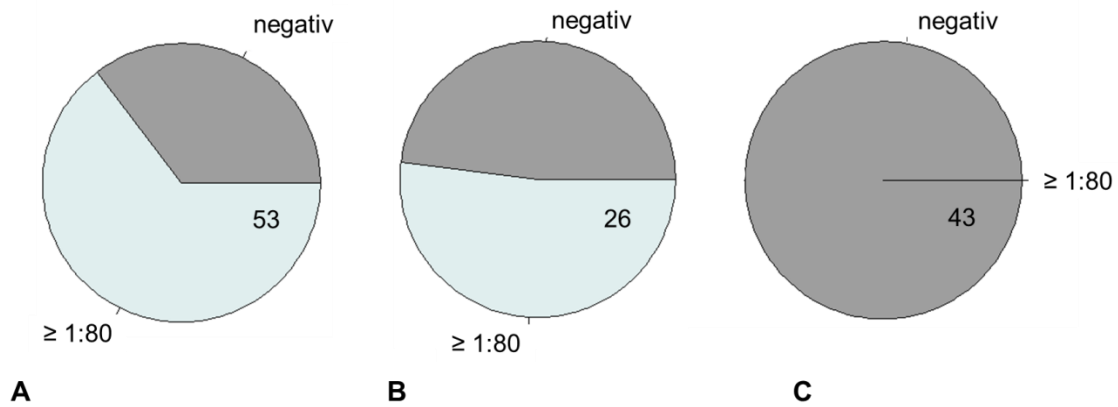


Abb. 13: Orientia-spezifisches IgG bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen

A: Anteil anti-Karp-IgG-positiver Proben in der nepalesischen Fallgruppe (53/82, 65%).
 B: Anteil anti-Karp-IgG-positiver Proben bei nepalesischen Blutspender:innen (26/50, 52%).
 C: Anteil IgG-positiver Proben bei deutschen Blutspender:innen (0/43, 0%). $p > 0,05$ mittels Fishers-Exakt-Test. Blau: IgG-positive Proben mit einem Titer $\geq 1:80$. Grau: Negativ getestete Seren.

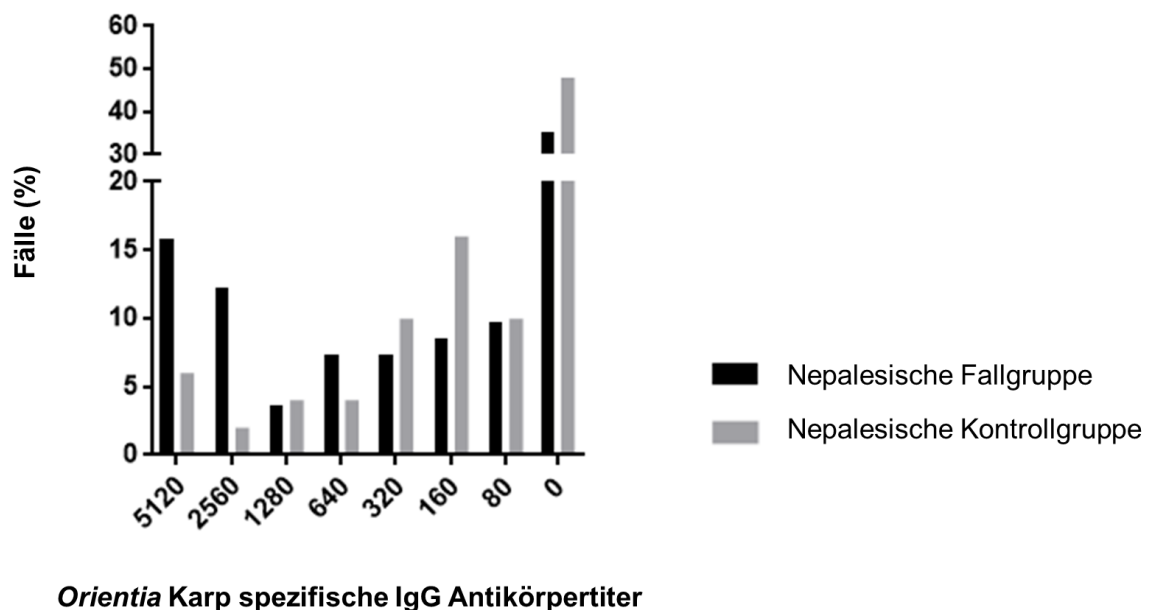


Abb. 14: Normalisierte Häufigkeitsverteilung der Orientia-spezifischen IgG-Titer

Für jeder Titerstufe von $\leq 1:80$ bis $\geq 1:5120$ wurde der relative Anteil an Proben aufgetragen, die positiv für IgG gegen Orientia Karp getestet wurden. Nepalesische Fallgruppe: Im IgM-Schnelltest positiv getestete Patient:innen mit akuter Fiebererkrankung. Nepalesische Kontrollgruppe: Asymptomatische Blutspender:innen. Die Titerhöhen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen, $p = 0,455$ (Chi-Quadrat-Test).

Die prozentuale Verteilung der *Orientia*-spezifischen IgG-Titerhöhen in der nepalesischen Fallgruppe und der nepalesischen Kontrollgruppe ist in Abb. 14 gezeigt. Die IgG-positiven Seren der nepalesischen Fallgruppe wiesen Titerhöhen von $\geq 1:80$ bis $\geq 1:5120$ auf. Die IgG-positiven Seren der nepalesischen Kontrollgruppe zeigten ebenfalls Titerlevel von $\geq 1:80$ bis $\geq 1:5120$. Dabei unterschieden sich die Titerhöhen der beiden nepalesischen Studiengruppen im Chi-Quadrat-Test ($p=0,455$) nicht signifikant.

3.2. Nachweis *Orientia*-spezifischer 16S DNA bei Patient:innen und Blutspender:innen

3.2.1. Analytische Sensitivität der *Orientia* 16S spezifischen rt qPCR

Um eine *Orientia* 16S-spezifische real time qPCR zum direkten Nachweis des konservierten ribosomalen pan-*Orientia* 16S-Gens in den nepalesischen Proben zu etablieren, wurde das 16S rt qPCR Protokoll von Sonthayanon et al. als Grundlage verwendet (Sonthayanon et al. 2009). Mit der Erweiterung der PCR um die interne Kontrolle RNaseP konnte festgestellt werden, dass alle Proben extrahierte humane DNA enthielten und keine Proben inhibiert waren. Entsprechend der DNA-Isolation betrug, bei einem eingesetzten Probenvolumen von 50 μl , die Menge des Eluats 60 μl . Dieses wurde gemäß dem PCR-Protokoll eingesetzt.

Um die analytische Sensitivität der 16S multiplex rt qPCR zu bestimmen, wurde eine Probit-Analyse (Tab. 9) nach Keller et al. durchgeführt (Keller et al. 2014). Hierzu wurde eine serielle Verdünnung von bekannten Konzentrationen des Plasmidstandards erstellt und deren Messungen in der PCR in mehreren Durchgangsläufen wiederholt. Das erhaltene Ergebnis ist das Detektionslimit der PCR, also die Menge DNA, die mit 95% Wahrscheinlichkeit detektiert wird. Bei einer Verdünnungsstufe des Plasmidstandards von $10^{-9,5}$ (entsprechend 16,7 Gen-Kopien/ 5 μl) konnten von 8 getesteten Proben 7 als positiv in der rt qPCR erkannt werden. Aufgrund der Probit-Analyse beträgt die analytische Sensitivität der hier neu etablierten *Orientia* 16S-spezifischen rt qPCR 12,01 *Orientia* 16S Kopien/ μl bei einem 95% Konfidenzintervall von 4,88–98,9 Kopien/ μl .

Tab. 9: Bestimmung der analytischen Sensitivität mittels Probit-Analyse
Verdünnungsstufen des Plasmidstandards von 10⁻⁴ bis 10^{-11,5}.

16S Standard Verdünnung	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ^{-8,5}	10 ⁻⁹	10 ^{-9,5}	10 ⁻¹⁰	10 ^{-10,5}	10 ⁻¹¹	10 ^{-11,5}
16S Kopien/ 5 µl	53* 10 ⁵	53* 10 ⁴	53* 10 ³	53* 10 ²	530	167,7	53	16,7	5,3	1,67	0,53	0,167
Anzahl pos. / Anzahl Getestete	4/4	3/3	3/3	4/4	8/8	4/4	7/8	7/8	3/8	2/8	0/8	0/4

3.2.2. Nachweis von *Orientia* 16S DNA in Seren von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und nepalesischen Blutspender:innen

Um die Seren der nepalesischen Fallgruppe auf *Orientia*-DNA zu untersuchen und die Konzentration zu quantifizieren, wurde mit der zuvor erfolgreich etablierten *Orientia* 16S-spezifischen rt qPCR die Testung auf *Orientia* 16S DNA durchgeführt. Gleichzeitig wurden die Seren der nepalesischen und der deutschen Kontrollgruppe in die qPCR eingesetzt und damit ebenfalls auf *Orientia*-DNA untersucht. 5 Proben aus der nepalesischen Fallgruppe wurden aufgrund von unzureichendem Material für die PCR Testung ausgeschlossen. Es gingen 77 Proben von Tsutsugamushifieber-Patient:innen in die PCR-Testung ein.

In der nepalesischen Fallgruppe fand sich *Orientia*-spezifische DNA bei 10/77 (13%) der getesteten Proben. Unter den zuvor mittels IFAT IgM-positiv getesteten Seren waren 9/36 (25%) auch positiv, während in der Gruppe der IFAT IgM-negativen nur 1/41 (2,4%) Serum PCR-positiv war.

Zur Überprüfung, ob ein positiver 16S qPCR Nachweis abhängig von einem positiven *Orientia*-spezifischem IgM-Antikörpernachweis in der IFAT ist, wurde der Fishers-Exakt-Test angewandt (Tab. 10). Ein p-Wert <0,05 galt als signifikant. Es zeigte sich bei einem p-Wert=0,0048, dass ein positives 16S qPCR Ergebnis abhängig von einem positiven *Orientia*-spezifischem IgM-Antikörpernachweis in der IFAT ist.

Tab. 10: 16S qPCR und *Orientia*-spezifischer IgM-Antikörpernachweis bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen
[#] p=0,0048 (Fishers-Exakt-Test)

	IgM IFAT (+) Nepalesische Fallgruppe	IgM IFAT (-) Nepalesische Fallgruppe	Gesamt
16S qPCR positiv	9 [#]	1 [#]	10
16S qPCR negativ	27	40	67
Gesamt	36	41	77

Überraschenderweise ließ sich in der nepalesischen Kontrollgruppe bei 6/50 (12%) Proben *Orientia*-DNA nachweisen. Davon hatten 4 Seren positive IgG-Antikörper in der IFAT und 2 Seren keine *Orientia* Karp-spezifischen IgG-Antikörper (Abb. 15). In der deutschen Kontrollgruppe war keine *O. tsutsugamushi* DNA mittels PCR nachweisbar. Bei $p > 0,2$ im Wilcoxon-Rangsummentest unterschieden sich die Konzentrationen von *Orientia* 16S Kopien/ ml, die in Abb. 15 gezeigt sind, nicht signifikant zwischen der nepalesischen Fallgruppe und den beiden Kontrollgruppen, die nepalesische und deutsche Kontrollgruppe untereinander auch nicht.

Die Sensitivität der 16S qPCR beträgt 13%, die Spezifität 88%. Dabei wurden von 77 Tsutsugamushifieber-Patient:innen 10 als richtig positiv erkannt und 44 von 50 gesunden nepalesischen Blutspender:innen als richtig negativ detektiert.

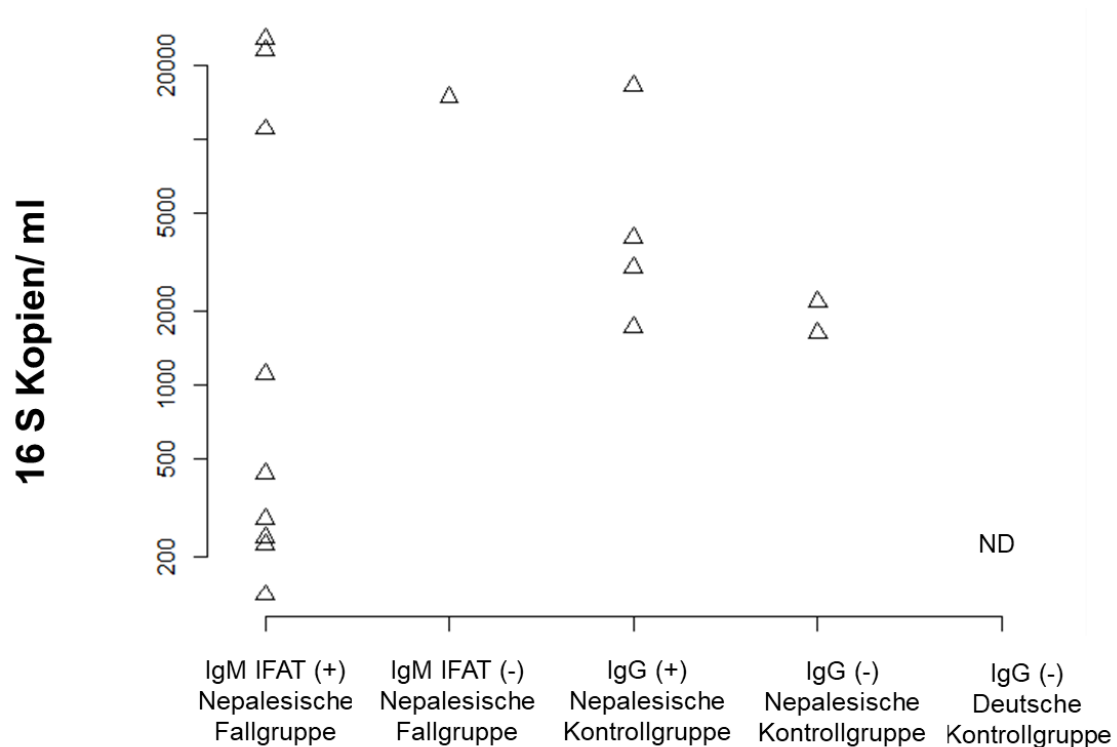


Abb. 15: Konzentration von *Orientia*-DNA (16S Kopien/ ml) im Serum

Die Aufschlüsselung der Studiengruppen erfolgte anhand der IFAT Antikörpernachweise. ND=nicht detektiert.

Nepalesische Fallgruppe: Im IgM-Schnelltest positiv getestete Patient:innen mit akuter Fiebererkrankung.

Nepalesische Kontrollgruppe: Asymptomatische Blutspender:innen.

Zum Ausschluss unspezifischer positiver 16S qPCR Ergebnisse bei den nepalesischen Blutspender:innen, die möglicherweise durch Ähnlichkeit mit 16S-Sequenzen anderer Bakterien verursacht wurden, fand ein Vergleich der Amplifikate der nepalesischen Kontrollgruppe mit der Fallgruppe im Gel statt. Dafür wurde die 16S qPCR Produkte im Agarosegel mittels UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 16). Es zeigten sich auch hier die 10 zuvor qPCR positiven Proben der nepalesischen Fallgruppe als auch die zuvor 6 qPCR positiven Proben der nepalesischen Kontrollgruppe als Banden mit einer Länge von 151bp im Gel. Die qPCR positiven Proben der nepalesischen Fallgruppe hatten Ct-Werte von 33,9 bis 37,1. In der nepalesischen Kontrollgruppe wiesen die qPCR positiven Proben Ct-Werte von 34,5 bis 35,9 auf. Somit erfolgte die Bestätigung der Spezifität der PCR Ergebnisse im Gel.

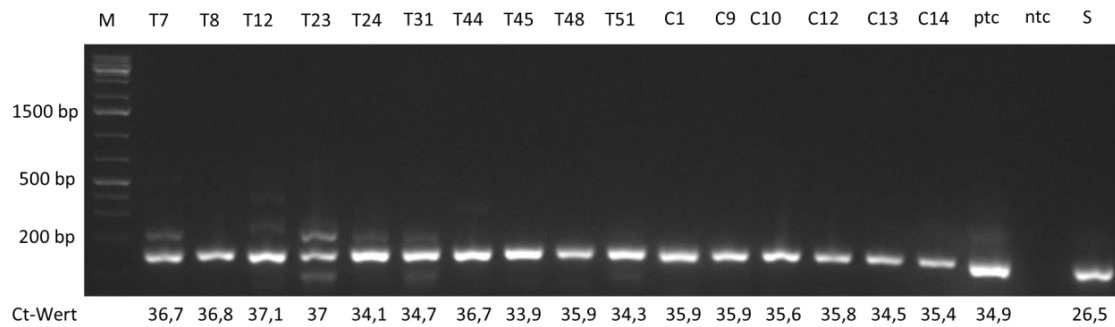


Abb. 16: 16S-Amplifikate bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen
 T=Nepalesische Fallgruppe. C=Nepalesische Kontrollgruppe. ptc=Positivkontrolle genomische DNA von *Orientia* Karp. ntc=Negativkontrolle mit H₂O. M=DNA-Marker. S=16S Standard in 10⁻⁶ Verdünnung.

Weiterhin wurden die *Orientia*-DNA positiven Proben aus der nepalesischen Kontrollgruppe nach Sanger sequenziert und auf *Orientia*-spezifische 16S DNA überprüft (Abb. 17). Die Sequenzen wurden dafür in BioEdit mit gängigen *Orientia*-Stammsequenzen verglichen und konnten hier ebenfalls als *Orientia*-spezifische 16S DNA bestätigt werden. Damit zusätzlich eine Kontamination ausgeschlossen werden konnte, erfolgte eine erneute Extraktion der DNA aus den Proben mit anschließender Reamplifizierung in der 16S rt qPCR. Die Ergebnisse der Nachtestung wichen nicht von den ursprünglichen ab. Eine Kontamination der Seren ließ sich somit ausschließen.

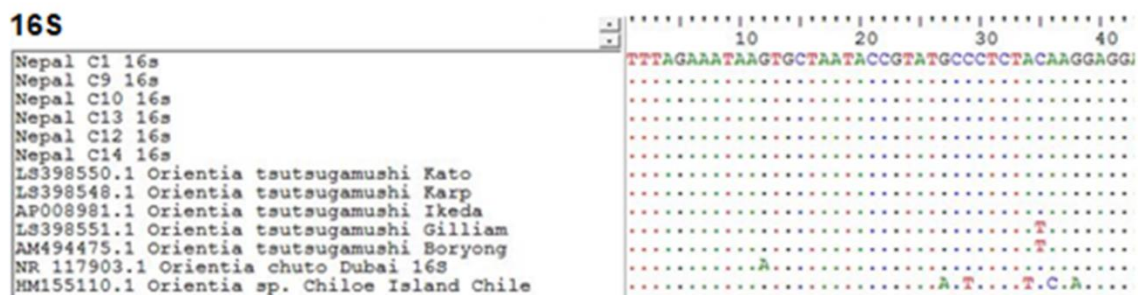


Abb. 17: 16S Sequenzen aus dem Serum sechs nepalesischer Blutspender:innen
 Multiples Alignment der 16S Sequenzen aus Seren 6 asymptomatischer Blutspender:innen im Vergleich mit 7 *Orientia*-Referenzstämmen. Darstellung der Sequenzen nach Trimming der Primer-Bindungsregion. Die *Orientia*-DNA positiven Proben aus der nepalesischen Kontrollgruppe zeigten 100% Homologie zu den Referenzstämmen Kato, Karp und Ikeda.

3.2.3. Ausschluss einer Infektion mit dem SFTS-Virus

Aufgrund der dem Tsutsugamushifieber ähnlichen klinischen Präsentation einer SFTS-Virus-Infektion sowie der in der Literatur berichteten Koinfektionen mit *O. tsutsugamushi* (Sato et al. 2017; Thi Hai Yen et al. 2019; Wi et al. 2016; Yoo et al. 2018; Kim et al. 2018) wurden alle Seren der Studiengruppen auf SFTS-Virus-spezifische RNA mittels real time RT PCR getestet (Yoshikawa et al. 2014). Es ergab sich kein Hinweis auf eine Infektion mit dem SFTS-Virus.

3.3. Nachweis des *Orientia*-spezifischen 47kD Gens in nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen

Zur Bestätigung der *Orientia*-spezifischen 16S qPCR Ergebnisse mit einer weiteren, unabhängigen molekularen Zielsequenz wurden die 10 zuvor 16S-DNA-positiven qPCR Seren aus der nepalesischen Fallgruppe als auch die 6 zuvor 16S-DNA-positiven Seren der nepalesischen Kontrollgruppe mittels rt qPCR auf das 47kD Gen untersucht. Mit dem PCR-Protokoll nach Jiang et al. (Jiang et al. 2004) waren in der nepalesischen Fallgruppe 9 von 10 Proben positiv. Keine der 6 Proben aus der nepalesischen Kontrollgruppe war positiv in der 47kD PCR (Abb. 18).

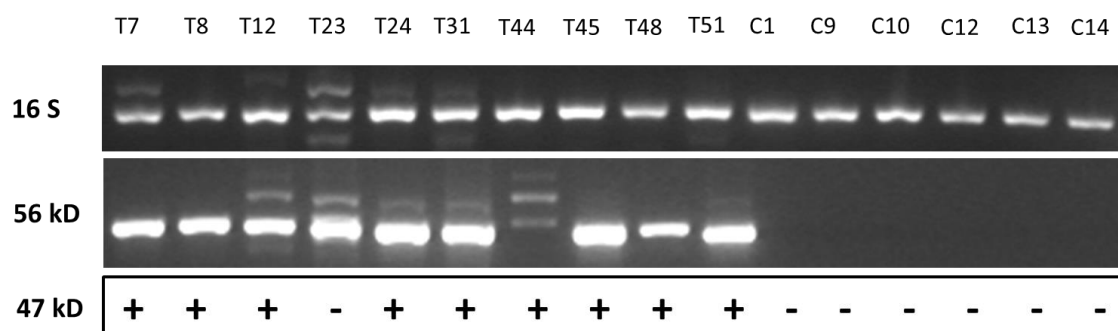


Abb. 18: 47kD Membranproteingen Nachweis durch *Orientia*-spezifische 47kD rt qPCR

Bei 9 Proben der nepalesischen Fallgruppe konnte ein Nachweis für das 47kD Gen erbracht werden. Agarosegele der Amplifikate aus der 16S rt qPCR und aus der 56kD PCR.

T=Nepalesische Fallgruppe. C=Nepalesische Kontrollgruppe.

Mittels 47kD PCR konnten also nur 16S positive Proben der Patient:innen mit akutem Tsutsugamushifieber, nicht jedoch die 16S positiven Proben aus der Gruppe der asymptomatischen nepalesischen Blutspender:innen bestätigt werden. Weiterhin ließen sich die schwach positiven 16S PCR Proben - beispielsweise T8 (Ct 36,8) und T12 (Ct 37,1) - aus der Fallgruppe (Abb. 16) mittels 47kD PCR bestätigen, während dies für die deutlich stärkeren 16S positiven Proben z.B. C13 (Ct 34,5) und C14 (Ct 35,4) aus der nepalesischen Kontrollgruppe nicht galt (Abb. 16). Damit kann das Ergebnis nicht an einer niedrigen Konzentration von *Orientia*-DNA in der jeweiligen Probe liegen.

3.4. Typisierung von *O. tsutsugamushi* mittels partieller Sequenzierung des 56kD Gens

Um *O. tsutsugamushi* in den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen typisieren zu können, wurden zunächst die 10 *Orientia* 16S DNA positiven Seren aus der nepalesischen Fallgruppe in der 56kD PCR nach Mahajan et al. amplifiziert (Mahajan et al. 2006). Mit dieser PCR, die die VD I des 56kD Gens von *O. tsutsugamushi* amplifiziert, wird ein PCR-Produkt mit einer Länge von 407bp generiert. Die Länge kann allerdings je nach Stamm variieren. Ebenfalls wurden die 6 *Orientia* 16S DNA positiven Seren der nepalesischen Kontrollen auf DNA des 56kD Gens untersucht. Bei 9/10 Proben der *Orientia* 16S DNA-positiven Seren aus der nepalesischen Fallgruppe fand sich eine für das 56kD Gen spezifische positive Bande. Bei den 6 *Orientia* 16S DNA-positiven Seren aus der nepalesischen Kontrollgruppe konnte keine spezifische Bande detektiert werden (Abb. 19).

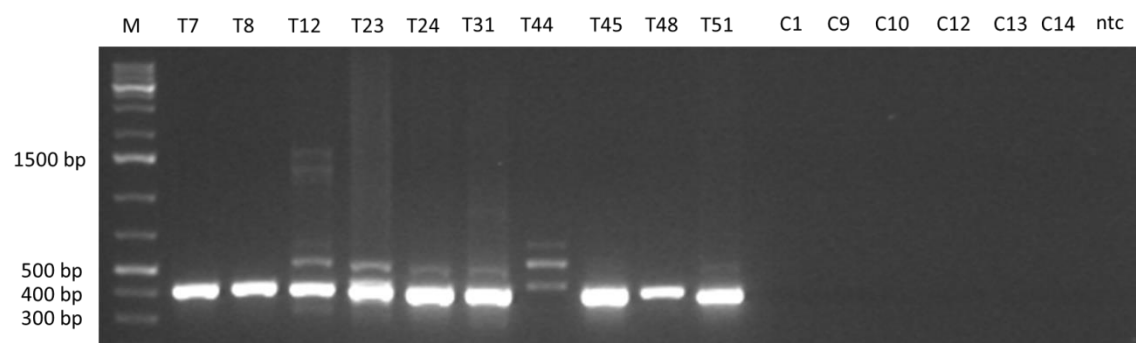


Abb. 19: 56kD Amplifikate bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen
T=Nepalesische Fallgruppe. C=Nepalesische Kontrollgruppe. ntc=Negativkontrolle mit H₂O.
M=DNA-Marker.

Die anschließende Sequenzierung der 56kD Amplifikate der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen war bei 6 der 9 Proben erfolgreich und erbrachte eine Sequenz für die VD I. Erfolgreich bidirektional sequenziert werden konnten die Amplifikate der Proben T7, T8, T24, T45, T48 und T51. In Tab. 11 findet sich die Verteilung der sequenzierten Seren auf die zwei Studienorte der Probensammlung in Nepal. Für die Typisierung wurden die Sequenzen in BioEdit mit häufig vorkommenden *Orientia*-Stammsequenzen verglichen.

Die phylogenetische Analyse zeigte, dass die Sequenzen aus den Proben T7, T8 und T24 sehr ähnlich waren und miteinander clustern, jedoch wie in Tab. 11 gezeigt, nicht vom gleichen Ort in Nepal stammen. Die Sequenzen aus den Proben T45, T48 und T51 wurden zwar am gleichen Ort akquiriert, clustern allerdings nicht (Abb. 20 und Tab. 11). Es zeigte sich somit keine klare Assoziation zwischen den Sequenzen der Seren und den Orten der Probensammlung. Weiterhin erbrachte die Testung den Nachweis, dass die nepalesischen Seren Ähnlichkeit mit den oft vertretenen *Orientia*-Stammsequenzen anderer Länder wie Thailand, Myanmar und Indien haben. Das *Orientia*-Stammvorkommen stellt sich damit als äußerst divers dar. Ein neuer *Orientia*-Stamm wurde nicht detektiert.

Tab. 11: Verteilung der sequenzierten Seren auf die 2 Orte der Probensammlung in Nepal

Standort 1 Bheri Zonal Hospital	Standort 2 Dhading District Hospital
T7, T8	T24, T45, T48, T51

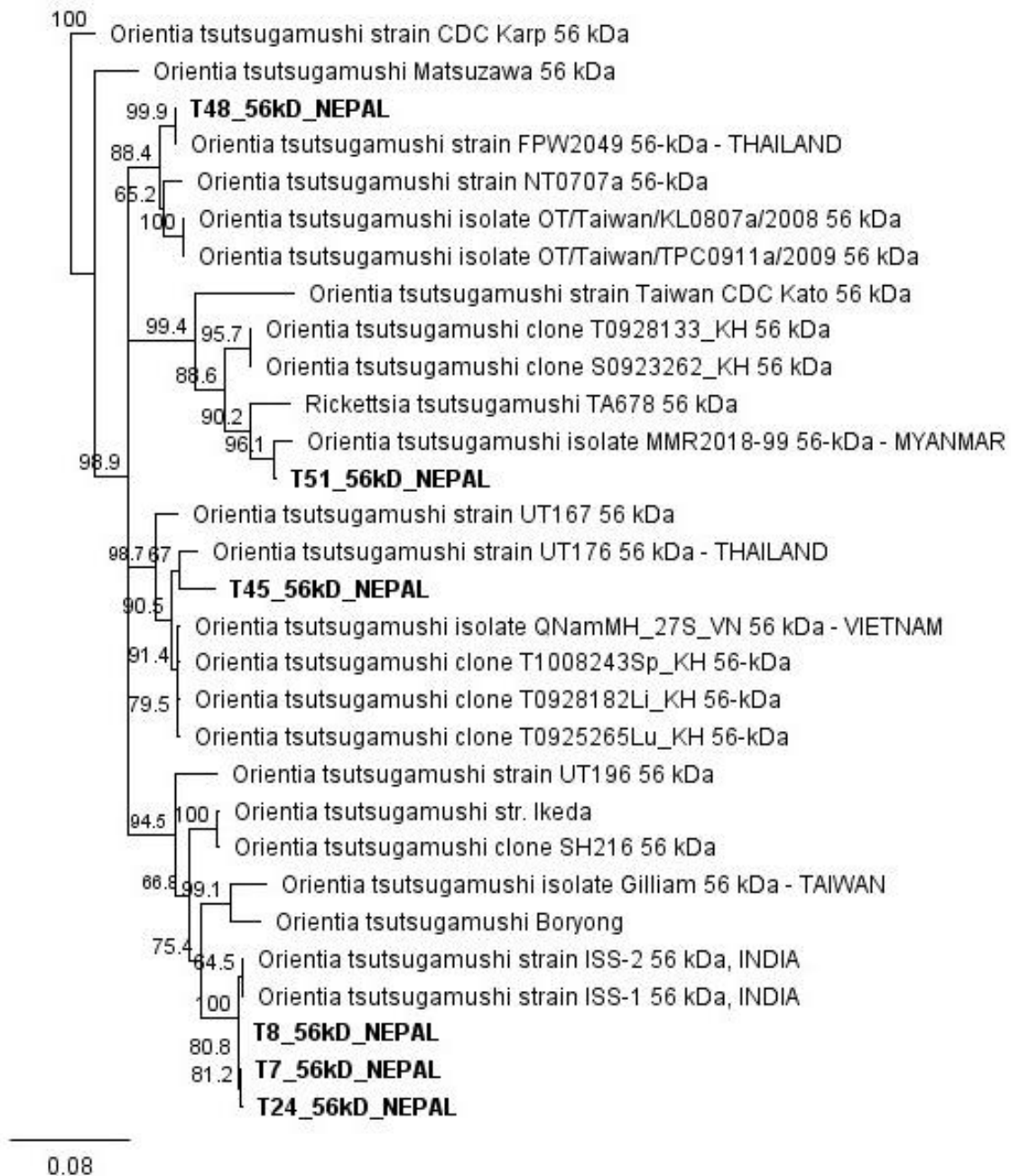


Abb. 20: Phylogenetischer Stammbaum der partiellen 56kD Sequenzen aus nepalesischen Patient:innen mit Tsutsugamushifieber

Nach Erstellung eines Multiple Alignment (Clustal W-Algorithmus, BioEdit 7.0.5.3-Software) wurde ein phylogenetischer Stammbaum mit Hilfe der Geneious-Software (Maximum Likelihood-Methode, Tamura-Nei-Modell) konstruiert.

3.5. Klinische Präsentation der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen

Um zu ermitteln, ob eine Korrelation der PCR Ergebnisse mit der klinischen Symptomatik und Befunden der Tsutsugamushifieber-Patient:innen besteht, wurden die durch Fragebogen und klinische Untersuchung erhobenen Daten und die 16S qPCR Ergebnisse mittels Fishers-Exakt-Test verglichen. Die abgefragten Parameter und erhobenen Befunde der Tsutsugamushifieber-Patient:innen mit einem *Orientia*-spezifischen 16S qPCR Ergebnis sind in Tab. 12 aufgeführt. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Die klinische Charakterisierung der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen mit *Orientia*-spezifischen 16S qPCR Ergebnissen erhob in der Anamnese bei fast allen Erkrankten einen Tierkontakt in den letzten 30 Tagen (96,1%) und eine Aktivität im Freien (96,1%). Klinisch präsentierte sich der Großteil der Tsutsugamushifieber-Patient:innen mit Kältegefühl (74,0%), Kopfschmerzen (66,2%), Übelkeit (72,7%), Erbrechen (57,1%) und Bauchschmerzen (57,1%). Einige gaben auch Diarrhoe (31,2%) und Gliederschmerzen (9,1%) an. In der körperlichen Untersuchung hatten 80,5% der Erkrankten Fieber $>38^{\circ}\text{C}$, 43% hatten Untergewicht, 29,8% wiesen eine generalisierte Lymphadenopathie auf und bei nur 16,1% ließ sich der pathognomonische Eschar finden. Auch waren ein Ikterus mit 11,7% und eine Hepatomegalie mit 10,4% weniger häufig vertreten (Tab. 12).

Hitzegefühl gaben 80% der Tsutsugamushifieber-Patient:innen, die in der 16S qPCR positiv waren an, bei den PCR negativen waren es nur 40%. Damit sind diese signifikant häufiger 16S qPCR positiv.

Untergewichtige Tsutsugamushifieber-Patient:innen hatten in nur 10% ein positives 16S qPCR Ergebnis, wohingegen 48% der PCR negativ Getesteten untergewichtig waren. Beim Vorliegen von Untergewicht fand sich also signifikant seltener ein positives 16S PCR Ergebnis.

Diarrhoe hatten 70% der 16S qPCR positiv getesteten Tsutsugamushi Patient:innen angegeben. Bei den PCR Negativen hatten 25% Durchfall. Diarrhoe wurde signifikant öfter bei einem 16S qPCR positiven Nachweis angegeben.

Vergrößerte Lymphknoten der Leiste waren bei 30% der 16S qPCR positiven in der nepalesischen Fallgruppe zu finden. Dies ist signifikant häufiger als bei den

16S qPCR Negativen, die nur in 5% der Fälle vergrößerte Leistenlymphknoten hatten (Tab. 12).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Symptome Hitzegefühl, Diarrhoe und Lymphadenopathie der Leiste tatsächlich häufiger bei den PCR-positiven Tsutsugamushifieber-Patient:innen vorkamen und bei deren Vorliegen ein hoher klinischer Verdacht einer Tsutsugamushifieber-Infektion bestehen sollte. Möglicherweise ist die PCR auch ein Indikator für Infektionen mit schwereren Verläufen.

Tab. 12: Klinische Charakteristika der Patient:innen mit Tsutsugamushifieber und 16S qPCR Ergebnissen

Tabelle der klinischen Daten modifiziert nach Binod Rayamajhee (KRIBS).

Klinische Charakteristika Anzahl (%)	Gesamt n=77	16S qPCR positiv n=10	16S qPCR negativ n=67	p-Wert (Fishers-Exakt-Test)
Hitzegefühl	35 (45,5%)	8 (80%)	27 (40,3%)	0,037
Kältegefühl	57 (74,0%)	9 (90%)	48 (71,6%)	0,439
Kopfschmerz	51 (66,2%)	8 (80%)	43 (64,2%)	0,480
Untergewicht	33 (42,9%)	1 (10%)	32 (47,8%)	0,037
Dyspepsie	27 (35,1%)	1 (10%)	26 (38,8%)	0,090
Übelkeit	56 (72,7%)	5 (50%)	51 (76,1%)	0,125
Erbrechen	44 (57,1%)	5 (50%)	39 (58,2%)	0,737
Bauchschmerz	44 (57,1%)	8 (80%)	36 (53,7%)	0,174

Diarrhoe	24 (31,2%)	7 (70%)	17 (25,4%)	0,008
Fieber (>38°C)	62 (80,5%)	9 (90%)	53 (79,1%)	0,676
Tachykardie (Herzfrequenz >100/min)	3 (3,9%)	0%	3 (4,5%)	1,000
Ikterus	9 (11,7%)	0%	9 (13,4%)	0,596
Knistern (Lunge)	9 (11,7%)	1 (10%)	8 (11,9%)	1,000
Gliederschmerz	7 (9,1%)	2 (20%)	5 (7,5%)	0,223
Hepatomegalie	8 (10,4%)	1 (10%)	7 (10,4%)	1,000
Lymphadenopathie (generalisiert)	24 (29,8%)	5 (50%)	19 (28,4%)	0,270
Lymphadenopathie (Hals)	12 (15,6%)	2 (20%)	10 (14,9%)	0,650
Lymphadenopathie (Axilla)	5 (6,5%)	0%	5 (7,5%)	1,000
Lymphadenopathie (Leiste)	6 (7,8%)	3 (30%)	3 (4,5%)	0,026
Tierkontakt (jeglicher in den letzten 30 Tagen)	74 (96,1%)	9 (90%)	65 (97%)	0,345
Eschar	13 (16,9%)	2 (20%)	11 (16,4%)	0,674
Aktivität im Freien (jegliche außerhalb des Hauses)	74 (96,1%)	10 (100%)	64 (95,5%)	1,000

3.6. Charakterisierung der systemischen Zytokinantwort bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen

Um die systemische pro-inflammatorische Immunantwort in den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen zu charakterisieren, wurden in den Seren der nepalesischen Fallgruppe die Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α mittels Multiplex-Immunoassay gemessen und für die Auswertung ausgewählt. Die nepalesischen und deutschen Kontrollgruppen wurden ebenfalls auf ihr Zytokinprofil getestet. Mittels Wilcoxon-Rangsummentest wurden die Studiengruppen paarweise miteinander verglichen, um einen möglichen Unterschied zwischen ihnen zu beobachten. Die Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Die Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-10, IFN- γ und TNF- α wurden für die Fallgruppe anhand des IgM-Nachweises in der IFAT eingeteilt, für die Kontrollgruppe anhand des IgG-Antikörpernachweises in der IFAT (Abb. 10 und Abb. 13). Die Ergebnisse werden in Abb. 21, Abb. 22, Abb. 23. und Abb. 24 in Boxplots dargestellt. Der mittlere Balken stellt den Median dar, die Box gibt das untere Quartil mit 25% der Datenwerte bis zum oberen Quartil mit 75% der Datenwerte an. Die äußeren Balken (*Whisker*) stellen den 1,5-fachen Abstand zwischen diesen Quartilen dar. Die Punkte sind die Ausreißer der Messung, sie liegen zwischen dem 1,5-fachen und 3-fachen Interquartilsabstand (IQR).

In der nepalesischen Fallgruppe wurden signifikant höhere IL-6 Konzentrationen als in den Kontrollgruppen sowohl aus Nepal als auch aus Deutschland gemessen (Abb. 21, $p < 0,0003$). Innerhalb der Tsutsugamushifieber-Patient:innen als auch innerhalb der nepalesischen Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der IL-6 Konzentrationen ($p = 0,3$ und $p = 0,6$). Zwischen der nepalesischen und deutschen Kontrollgruppe ließ sich zudem ein signifikanter Unterschied der IL-6 Konzentrationen beobachten, $p < 0,0009$, wobei die deutsche Kontrollgruppe im Median höhere Konzentrationen zeigte.

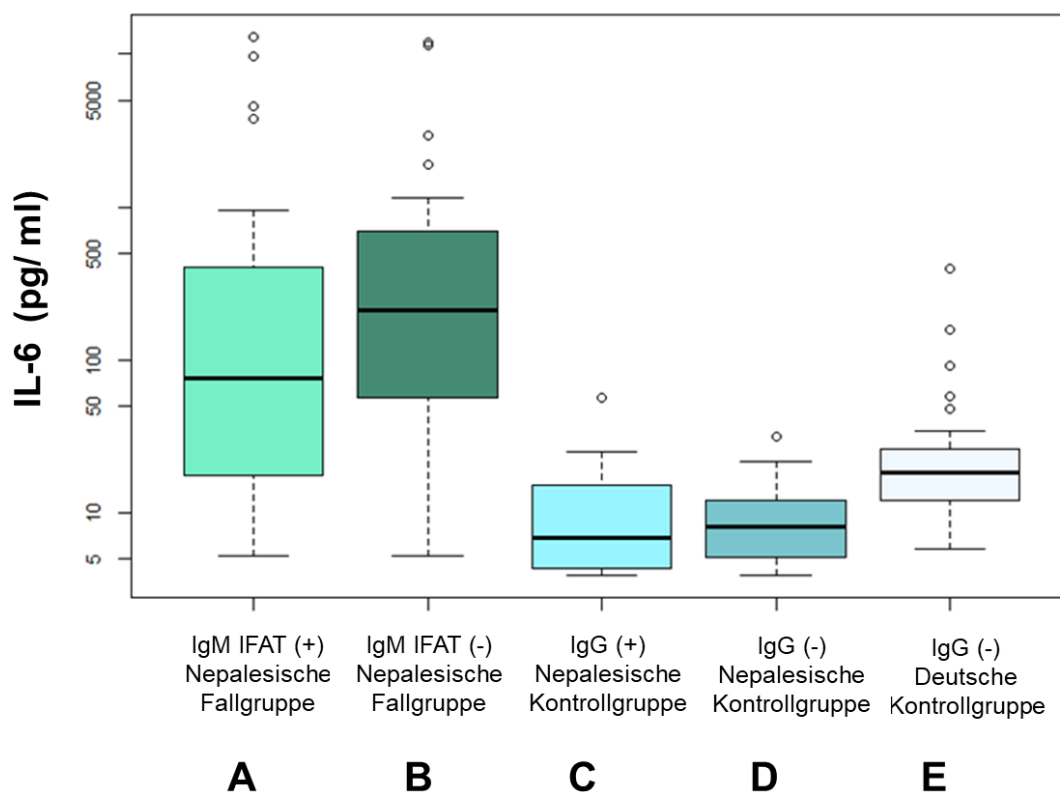


Abb. 21: IL-6 im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen
 Messung der Konzentration im Serum erfolgte mittels Multiplex-Zytokin Assay im FACS.
 Anzahl gemessener Proben: A: n=34, B: n=32, C: n=22, D: n=18, E: n=42.
 Anzahl der Proben unter der Nachweisgrenze: A: n=2, B: n=11, C: n=4, D: n=6, E: n=1.
 Mittel=Median. Box=unteres bis oberes Quartil (0,25-0,75). Whisker=1,5xIQR.
 Punkte=Ausreißer. Im Wilcoxon-Rangsummentest: Signifikante Unterschiede zwischen A, B und C, D, E. Signifikanter Unterschied zwischen C, D und E. Kein signifikanter Unterschied zwischen A und B, sowie zwischen C und D.

Die Messung von IL-10 (Abb. 22) zeigte in allen getesteten und miteinander verglichenen Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede der Konzentrationen von IL-10 im Serum ($p=1,0$).

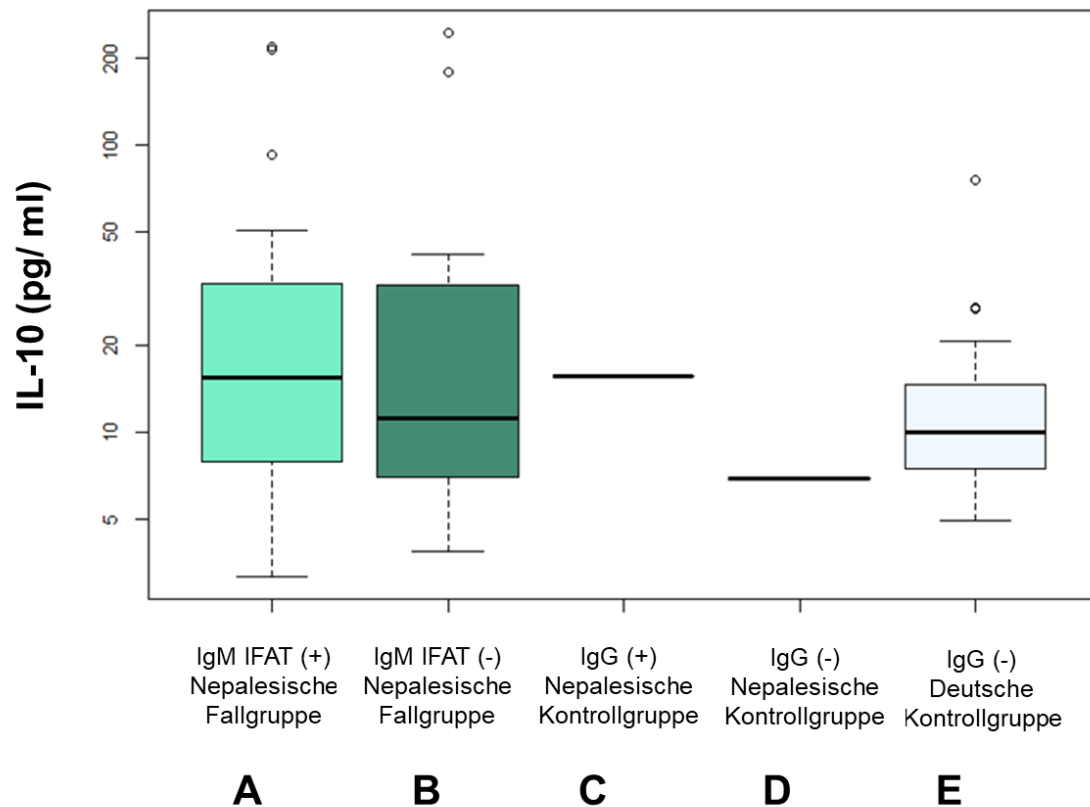


Abb. 22: IL-10 im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen
 Messung der Konzentration im Serum erfolgte mittels Multiplex-Zytokin Assay im FACS.
 Anzahl gemessener Proben: A: n=21, B: n=15, C: n=1, D: n=1, E: n=26.
 Anzahl der Proben unter Nachweisgrenze: A: n=15, B: n=28, C: n=25, D: n=23, E: n=17.
 Mittel=Median. Box=unteres bis oberes Quartil (0,25-0,75). Whisker=1,5xIQR.
 Punkte=Ausreißer. Im Wilcoxon-Rangsummentest: Keine signifikanten Unterschiede zwischen A, B, C, D, E.

Die Messung des hauptsächlich von Lymphozyten produzierten Zytokins IFN- γ (Abb. 23) zeigte in der IgM IFAT (+) nepalesischen Fallgruppe signifikant höhere IFN- γ Konzentrationen als in den Kontrollgruppen sowohl aus Nepal als auch aus Deutschland, $p < 0,01$. Die IgM IFAT (-) nepalesischen Seren zeigten keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ Konzentrationen zu den nepalesischen Kontrollgruppen bei $p > 0,09$, allerdings einen signifikanten Unterschied zu den deutschen Kontrollen, $p = 0,0038$. Innerhalb der Tsutsugamushifieber-Patient:innen als auch zwischen allen Kontrollgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der IFN- γ Konzentrationen bei jeweils $p = 0,7$.

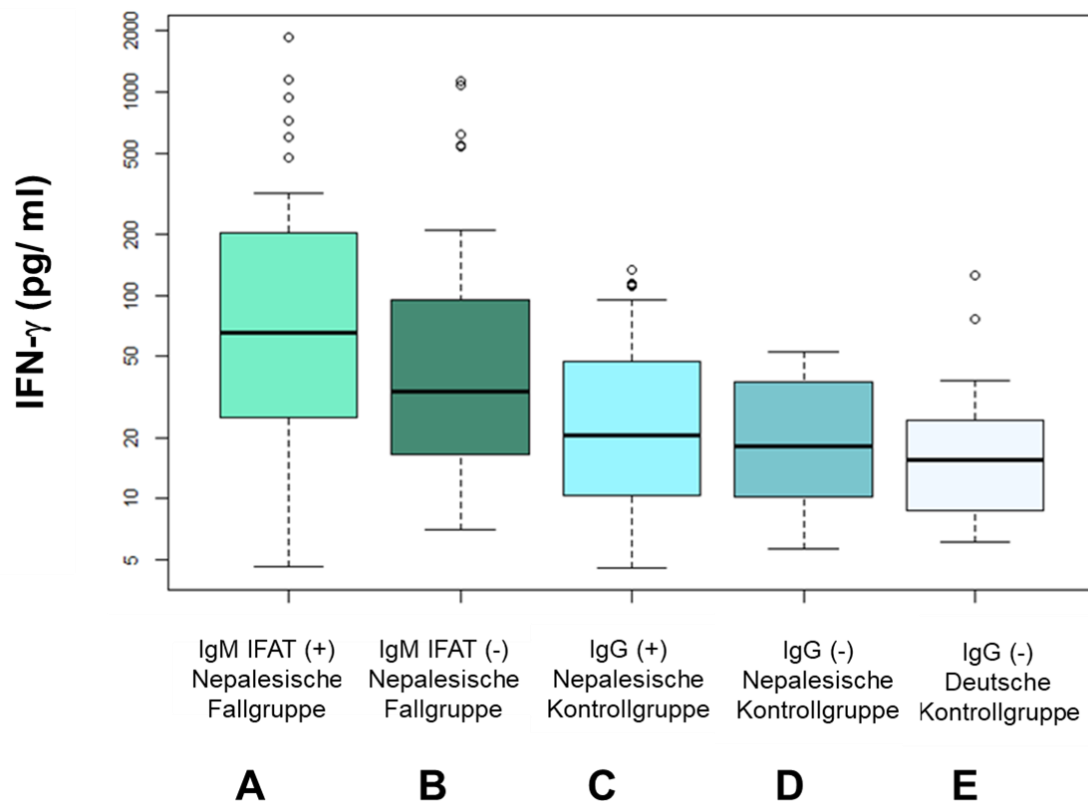


Abb. 23: IFN- γ im Serum von Tsutsugamushifieber-Patient:innen und Blutspender:innen
 Messung der Konzentration im Serum erfolgte mittels Multiplex-Zytokin Assay im FACS.
 Anzahl gemessener Proben: A: n=36, B: n=36, C: n=23, D: n=22, E: n=30.
 Anzahl der Proben unter Nachweisgrenze: A: n=0, B: n=7, C: n=3, D: n=2, E: n=13.
 Mittel=Median. Box=unteres bis oberes Quartil (0,25-0,75). Whisker=1,5xIQR.
 Punkte=Ausreißer. Im Wilcoxon-Rangsummentest: Signifikante Unterschiede zwischen A und C, D, E. Signifikanter Unterschied zwischen B und E. Keine signifikanten Unterschiede zwischen A und B, sowie zwischen C, D, E.

Die Messung der Konzentration von TNF- α im Serum (Abb. 24) zeigte in allen getesteten und miteinander verglichenen Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede in der Höhe gemessenen TNF- α Konzentrationen, $p > 0,6$.

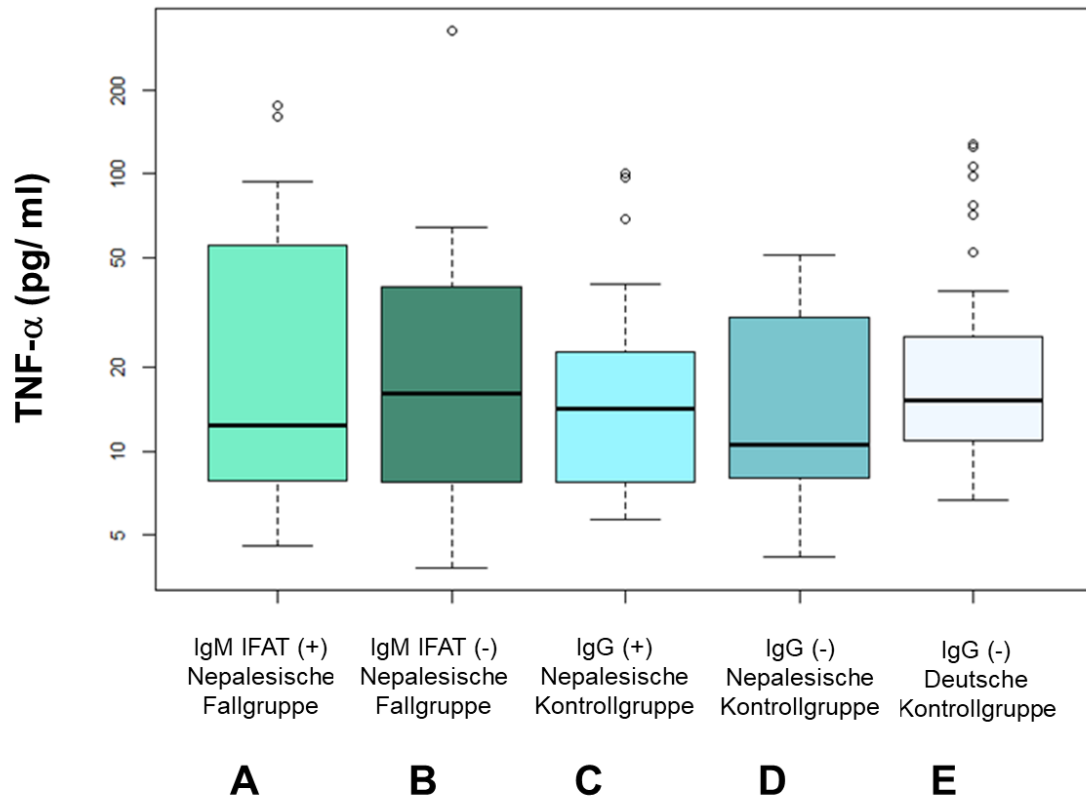


Abb. 24: TNF- α im Serum von Tsutsugamushiefieber-Patient:innen und Blutspender:innen
 Messung der Konzentration im Serum erfolgte mittels Multiplex-Zytokin Assay im FACS.
 Anzahl gemessener Proben: A: n=32, B: n=31, C: n=24, D: n=21, E: n=42.
 Anzahl der Proben unter Nachweisgrenze: A: n=4, B: n=12, C: n=2, D: n=3, E: n=1.
 Mittel=Median. Box=unteres bis oberes Quartil (0,25-0,75). Whisker=1,5xIQR.
 Punkte=Ausreißer. Im Wilcoxon-Rangsummentest: Keine signifikanten Unterschiede zwischen A, B, C, D, E.

Zusammenfassend ließen sich für die untersuchten Serumkonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN- γ signifikante Unterschiede in der Entzündungsreaktion zwischen den nepalesischen Tsutsugamushiefieber-Patient:innen mit positivem IgM-Nachweis und den Kontrollgruppen verzeichnen. Für die Entzündungsmarker IL-10 und TNF- α konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen beobachtet werden.

4. Diskussion

4.1. Seroprävalenz von *Orientia*-spezifischen Antikörpern in Nepal

4.1.1. IgM-Serostatus bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen

In der vorliegenden Arbeit konnte der positive *Orientia*-IgM-Nachweis im Schnelltest bei den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen mittels Goldstandardverfahren der IFAT in 46% der Fälle für IgM-Antikörper gegen *Orientia* Karp und Kato bestätigt und um Sido erweitert werden. 32% der Tsutsugamushifieber-Erkrankten hatten *Orientia* Karp spezifische IgM-Antikörper. In der Literatur existieren Beobachtungen direkter *Orientia*-Sequenz Nachweise u.a. aus Japan, Südkorea und China, die in ca. 40% der Fälle Hinweise auf *Orientia* Karp erbracht haben (Kelly et al. 2009). Obwohl IFAT-Daten zu Karp spezifischen Antikörpervorkommen nicht im Detail und systematisch beschrieben sind, könnten Nachweise Karp spezifischer Antikörperreaktionen einen indirekten Hinweis auf den ursächlichen *Orientia*-Stamm liefern. 4% (n=2, Titer 1:20) der gesunden nepalesischen Blutspender:innen hatten ebenfalls einen positiven *Orientia* Karp IgM-Nachweis. Bei den positiven Gesunden könnte es sich dabei um residuale *Orientia*-IgM-Antikörper nach einer akuten Infektion handeln. Nach Symptombeginn findet der IgM-Antikörperanstieg über 2-3 Wochen statt und hat seinen Höhepunkt in der 4. Woche, ein schneller IgM-Antikörperabfall geschieht dann in der 5. Woche nach Krankheitsbeginn. Im Median werden mittels IFAT IgM-Titer von 1:10 nach einem Jahr beobachtet (Kim et al. 2010; Saunders et al. 1980). Die IgM-Antikörperbildung gegen *O. tsutsugamushi* nach dem Krankheitsbeginn benötigt 5-6 Tage bis serologische Tests ansprechen (Kannan et al. 2020; John und Varghese 2020). In dieser Arbeit bleibt unklar, zu welchem Zeitpunkt sich die Tsutsugamushifieber-Patient:innen im Krankenhaus vorstellten. Sollten sie sich in den ersten 7 Tagen vorgestellt haben, besteht die Möglichkeit, dass der Schnelltest noch keine gebildeten IgM-Antikörper erfassen konnte (John und Varghese 2020; Kannan et al. 2020). Der Anteil Schnelltest Negativer in dieser Arbeit ist allerdings nicht bekannt.

Der in Nepal verwendete InBios IgM-Schnelltest deckt die Serotypen Karp, Kato, Gilliam und TA716 ab, in der hier anschließend durchgeführten IFAT konnte zuerst auf Karp, dann Kato und erweitert auf Sido IgM-Antikörper getestet werden. Da in europäischen Laboren nicht so viele *Orientia*-Isolate zur Verfügung stehen, konnte die Reaktivität mit Antigenen der beiden weiteren im Schnelltest enthaltenen *Orientia*-Stämme Gilliam und TA716 nicht überprüft werden. Die Diskrepanz zwischen IgM-Schnelltest positiven Ergebnissen und positiven Testungen in der IFAT können daher mit einer Infektion durch einen Stamm, der nicht durch die IFAT erfasst werden konnte, mit einer niedrigen Spezifität des Schnelltest oder einer niedrigen Sensitivität der IFAT erklärt werden. Um abschließend eine Aussage zu erhalten, ob sich alle Schnelltest-Positiven mittels IFAT bestätigen lassen können, wäre an dieser Stelle eine IFAT Austestung von Antikörpern gegen alle *Orientia*-Stämme erforderlich, auf die im RDT zuvor getestet wurde.

Fraglich ist weiterhin die grundsätzliche Eignung der IFAT zur Diagnostik und ob diese überhaupt einen Vorteil zum Schnelltestverfahren bietet. Einen klaren Vorteil bietet die IFAT durch ihre quantitative Einschätzung über die Titerhöhen der Antikörper, der Schnelltest ist dabei nur ein qualitatives Verfahren. Für die Aussagekraft der IFAT ist es wichtig, die Antigenauswahl an das lokale Stammvorkommen anzupassen sowie eine diagnostische Titergrenze festzulegen (Blacksell et al. 2007a). Dafür empfiehlt sich ein ≥ 4 -facher Antikörper Anstieg von gepaarten Proben mit einer Blutabnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten, einmal zu Beginn der akuten Infektion und dann in der Rekonvaleszenz (Blacksell et al. 2007a; Sonthayanon et al. 2006). Eine einzelne für das Tsutsugamushifieber-Endemiegebiet allgemein gültige Titergrenze konnte bisher nicht festgelegt werden (Kingston et al. 2015). In der Arbeit von Lim et al. konnte bei der Suche nach einem optimalen Cut-off Titer für die Immunfluoreszenz ein IgM-Titer von $\geq 1:3200$ bei Erstaufnahme oder ein ≥ 4 -facher Titeranstieg $\geq 1:3200$ bei Genesung festgestellt werden. Die Sensitivität betrug 82% und die Spezifität 100% (Lim et al. 2015). Kannan et al 2020 stellen eine Sensitivität von 95% und eine Spezifität von 74% für die IFAT fest (Kannan et al. 2020). In einer weiteren Studie wurde in der Immunfluoreszenz ein Cut-off Titer von 1:400 für eine IgM-Seropositivität gewählt, da gepaarte Proben nicht zur Verfügung standen, um einen möglichen

4-fachen Titeranstieg zu beobachten (Ruang-Areerate et al. 2011). Auch in der hier gemachten Untersuchung lagen keine gepaarten Proben vor. Da niedrige Titer von 1:20 bei nur 2 gesunden nepalesischen Blutspender:innen zu finden waren, galten gemäß der Studienergebnisse Titer ab $\geq 1:40$ als hochspezifisch bei den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Erkrankten. Allerdings würde eine Anhebung des Cut-off Titers auf 1:40 zu einer Einschränkung der Sensitivität der IFAT führen.

Obwohl Kannan et al. eine hohe Sensitivität (95%) für die IFAT feststellen können (Kannan et al. 2020), bleibt dieses Testverfahren zwischen Laboratorien schlecht vergleichbar, da es darauf ankommt, auf welche Serotypen getestet wird. Die IFAT erfordert erfahrenes Personal, ist teuer und limitiert durch *Orientia*-Hintergrundantikörpertiter in endemischen Regionen sowie eine Kreuzreaktivität der *Orientia*-Antikörper (Kingston et al. 2015). Da es sich dementsprechend als schwierig erweist, einen generellen Grenzwert für die serologische Diagnosestellung zu benennen, sollten weitere Untersuchungen zur regionalen Dynamik von Antikörpertitern in nepalesischen Tsutsugamushifieber-Erkrankten wie in der südkoreanischen Studie von Kim et al 2010 zur Unterscheidung einer akuten von einer durchgemachten Infektion im lokalen endemischen Umfeld gemacht werden (Kim et al. 2010).

In der Studie von Kingston et al. wurde der kommerzielle InBios Scrub Typhus Detect IgM-Schnelltest mit der IFAT verglichen, dabei wurden auch wie bei dieser Arbeit nicht alle Serotypen des Schnelltests in der IFAT verwendet. Die Diagnostik erfolgte analog zur Diagnosestellung in dieser Arbeit, verblindet im 4 Augen Prinzip, als Endpunkt der höchste Titer mit noch spezifischer Fluoreszenz (Kingston et al. 2015). Dabei wies der Schnelltest eine Sensitivität von 82% und eine Spezifität von 98% auf (Kingston et al. 2015). Auch andere Studien zeigen eine geringere Sensitivität und höhere Spezifität von Immunchromatographie basierten Schnelltests für Tsutsugamushifieber (Blacksell et al. 2010; Blacksell et al. 2012). Es zeigte sich allerdings, dass die Höhe des gemessenen IgM-Titers in der Immunfluoreszenz mit der Wahrscheinlichkeit eines positiven Schnelltests korreliert. Die Sensitivität des Schnelltests steigt dann auf 92% bei einer Spezifität von 95% (Kingston et al. 2015).

Eine weitere Studie zeigt für den Inbios IgM-Schnelltest eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 96% (Elangovan et al. 2019). Die Studie von Kannan et al. stellt für den InBios Schnelltest eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität von 89% fest. Für andere kommerzielle Tests sogar jeweils 92% (Kannan et al. 2020). Insgesamt zeigt sich in allen Studien eine Sensitivität und Spezifität der kommerziellen Schnelltests um die 90%, diese erfüllen somit wichtige Anforderungen an einen Schnelltest in Tsutsugamushifieber-Endemiegebieten und erweisen sich prinzipiell als geeignet für den Einsatz in Nepal (John und Varghese 2020; Kannan et al. 2020; Elangovan et al. 2019; Kingston et al. 2015).

Eine mögliche diagnostische Alternative zur IFAT - abgesehen von Schnelltests - könnte der Einsatz von ELISAs in Nepal sein (Gautam et al. 2020). Der *Orientia*-IgM ELISA weist eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 96% auf (Elangovan et al. 2019), in anderen Studien liegen diese bei 92% und 94% (John und Varghese 2020; Kannan et al. 2020). Inwiefern dieses Testverfahren bei limitierten Ressourcen praktikabel und sinnvoll für Nepal ist, gilt es zu evaluieren.

4.1.2. IgG-Seroprävalenz in der nepalesischen Bevölkerung

Das Vorliegen von *Orientia*-IgG-Antikörpern in der gesunden nepalesischen Bevölkerung wurde bislang noch nicht untersucht. *Orientia*-Seroprävalenzdaten für gesunde Blutspender:innen gibt es nur in sehr wenigen Studien. Eine Arbeit aus Indien konnte innerhalb einer Gruppe gesunder Blutspender:innen bei 15% eine Seroprävalenz von *Orientia*-spezifischen Antikörpern finden (Sengupta et al. 2015). Für Nepal wurde dies bislang noch nicht berichtet.

In beiden hier untersuchten nepalesischen Studiengruppen wurde mittels IFAT ein hoher Anteil an Proben mit IgG-Antikörpern gegen den Karp-Stamm von *O. tsutsugamushi* gefunden, teils mit Antikörpertitern $\geq 1:5120$. 65% der akut erkrankten Tsutsugamushifieber-Patient:innen und 52% der gesunden nepalesischen Blutspender:innen hatten spezifische IgG-Antikörper. Die Unterschiede im *Orientia*-spezifischem IgG-Antikörpervorkommen und bei den Titerhöhen zwischen der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe waren nicht signifikant.

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen IgG-Antikörper in den gesunden Blutspender:innen indizieren eine hohe Seroprävalenz von *Orientia*-Antikörpern in der nepalesischen Bevölkerung. Es ist ein Hinweis auf einen Kontakt mit dem Erreger zu einem früheren Zeitpunkt. Die Auswahl des Karp-Antigens basierte auf dem 40-50%-igen Vorkommen dieses Serotypes in endemischen Regionen (Kelly et al. 2009; Lu et al. 2010). Der hohe Anteil an Proband:innen mit IgG gegen *Orientia* Karp in den nepalesischen Studiengruppen spiegelt dies auch für Nepal wieder. Möglicherweise ist die Seroprävalenz sogar noch höher, da nur IgG-Antikörper gegen einen *Orientia*-Stamm untersucht wurden. Dies sind die bislang einzigen und somit höchsten dokumentierten *Orientia*-Seroprävalenzdaten für Nepal.

IgG-Antikörper werden für gewöhnlich im späteren Stadium einer Infektion gebildet. Bei einer Tsutsugamushifieber-Erkrankung steigen die IgG-Antikörperlevel im Serum in den ersten 2 Wochen nach Symptombeginn bereits stark an. Ein Peak in der IFAT wird nach 4 Wochen erreicht, danach fallen sie wieder ab, wenn auch langsamer als IgM-Antikörper (Kim et al. 2010). Nach 1,5 Jahren lassen sich im Median noch *Orientia*-IgG-Antikörpertiter von 1:128 nachweisen (Kim et al. 2010). Die Serokonversion kann daher als Zustand nach einer abgelaufenen Infektion, aber auch – wenn IgM- und IgG-Antikörper gleichzeitig vorliegen – als Zeichen der Spätphase einer akuten Infektion oder als Reinfektion gewertet werden. Die Seroprävalenz stellt demnach auch eine Störgröße für die Diagnosestellung dar. Abschließend kann im Falle des Nachweises von IgG-Antikörpern gegen *O. tsutsugamushi* bei symptomatischen Patient:innen nicht gesagt werden, ob es sich um Hintergrundantikörper nach bereits durchgemachter Infektion oder tatsächlich um frisch gebildete Antikörper im Rahmen eines akut aufgetretenen Tsutsugamushfiebers handelt. Diese Schwierigkeit zeigt sich auch in den sich nicht signifikant unterscheidenden IgG-Titerhöhen zwischen den nepalesischen Studiengruppen. Fraglich ist, ob das Vorliegen von *Orientia*-IgG-Antikörpern in Hochendemiegebieten überhaupt einen diagnostischen Wert für die klinische Akutdiagnostik hat. Zumindest erscheinen IgG-Einzeltiter für eine Diagnosestellung nicht geeignet.

Es gibt Schnelltests, die gleichzeitig – getrennt mit je einer unterschiedlichen Bande – einen IgM- und IgG-Antikörpernachweis ermöglichen. Sie sind prinzipiell sowohl für die Beobachtung des Krankheitsverlaufes als auch einer

Reinfektion geeignet. Ein solcher Test wurde in der nepalesischen Studie von Pokhrel et al. verwendet, die von 2018 bis 2019 Proben aus verschiedenen Distrikten in Nepal auf eine Seroprävalenz des Tsutsugamushiefiebers bei erwachsenen Patient:innen mit unklarem Fieber untersucht hat (Pokhrel et al. 2021). Der ImmuneMed Scrub Typhus Schnelltest mit einer Sensitivität von 97% und einer Spezifität von 100% kann IgM- und IgG-Antikörper gegen die fünf *Orientia*-Stämme Gilliam, Karp, Kato, Kangwon, Boryong (Kim et al. 2016b) detektieren. Dabei waren 12% der Getesteten positiv für *Orientia*-Antikörper. Als seropositiv galt ein IgM- oder/und IgG-Antikörpernachweis, diese wurden in der Studie leider nicht einzeln aufgeführt (Pokhrel et al. 2021). Die Aufschlüsselung der Antikörperantworten könnte eine Möglichkeit bieten, um einzuordnen, ob es sich um den Zustand nach einer abgelaufenen Infektion, die Spätphase einer akuten Infektion oder eine Reinfektion handelt.

Im Verlauf der Immunantwort nimmt die Bindungsstärke von Antikörpern zum Antigen – in der Summe die Avidität – zu. Die Messung der Avidität ermöglicht eine ungefähre Abschätzung des Infektionszeitpunktes. In Zukunft sollte auch die *Orientia*-spezifische IgG-Antikörperantwort und ihre Affinität in der nepalesischen Bevölkerung, beispielsweise anhand von Aviditätstestungen mittels ELISA, weiter charakterisiert werden. Eine Schwierigkeit stellt allerdings erneut die Wahl eines hochspezifischen Antigens dar, da auch hier das Problem der möglichen Kreuzreaktivität besteht, bei der sich die Aviditäten überlagern könnten.

4.2. *Orientia*-spezifische 16S und 47kD DNA Nachweise in der nepalesischen Population

Die durch die verzögerte Antikörperbildung entstehende diagnostische Lücke zu Beginn der Erkrankung kann durch den direkten *Orientia*-DNA Nachweis mittels PCR geschlossen werden (Kannan et al. 2020).

Orientia 16S DNA wurde bei 10 Seren (13%) der Gruppe der akut erkrankten Tsutsugamushiefieber-Patient:innen detektiert. Bei den gesunden Blutspender:innen zeigten 6 Seren (12%) einen *Orientia* 16S DNA Nachweis. Dabei waren die Ct-Werte ähnlich und auch die Konzentrationen von *Orientia* 16S Kopien/ ml unterschieden sich nicht signifikant. Ein positives 16S qPCR Ergebnis war aber abhängig von einem positiven *Orientia*-spezifischem IgM-

Antikörpernachweis in der IFAT. Mittels 47kD rt qPCR (Jiang et al. 2004) konnten nur die 16S rt qPCR positiven Proben der symptomatischen nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen bestätigt werden, jedoch nicht die der gesunden nepalesischen Blutspender:innen. Hierbei hatte die Konzentration der *Orientia*-DNA in den Studienproben keinen Einfluss auf das 47kD qPCR Ergebnis, was sich anhand der Ct-Werte zeigte. Weshalb eine Diskrepanz zwischen den 16S und 47kD PCR Ergebnissen besteht, bleibt unklar. Festgehalten werden kann, dass es nicht an einer höheren Sensitivität der 16S qPCR gelegen haben kann, da die *Orientia*-DNA in den Studiengruppen ähnlich hoch konzentriert war.

Die in dieser Arbeit verwendete *Orientia*-spezifische 16S multiplex rt qPCR nach Sonthayanon et al. hat nach Analyse der Autor:innen verglichen mit der IFAT (positiv bei IgM-Titer $\geq 1:400$, IgG-Titer $\geq 1:800$ oder mindestens 4-fache IgM-/IgG-Titeranstiege) eine Sensitivität von 45% und eine Spezifität von 100% (Sonthayanon et al. 2006). Die DNA-Extraktion fand aus 5 ml Vollblut, anders als in der vorliegenden Arbeit (s.u.), statt. Als mögliche Gründe für eine niedrigere Sensitivität im endemischen Umfeld nennen die Autor:innen PCR Inhibitoren, den Abbau infizierter Zellen, Probenmedium Unterschiede von Vollblut und Buffy Coat, eine zu große Verdünnung, mangelnde DNA Extraktion, eine niedrige Bakterienlast, unspezifische IFAT Ergebnisse, sowie das Vorliegen einer Reinfektion mit schnellerer Bakterienelimination (Sonthayanon et al. 2006).

In einer Studie aus Thailand wurde aus Vollblut unter Verwendung der gleichen PCR bei 52% ein positiver *Orientia* 16S qPCR Nachweis erbracht. Zuvor war mittels IFAT IgM-positiv auf Tsutsugamushifieber getestet worden (Sonthayanon et al. 2009). In einer nepalesischen Studie wurde bei Patient:innen mit klinischem Tsutsugamushifieber-Verdacht in 30% von insgesamt 282 Fällen ein 16S rRNA Nachweis aus Buffy Coat erbracht. Der Anteil liegt damit mehr als doppelt so hoch wie in der vorliegenden Arbeit, in der in 13% von 77 Fällen ein 16S rRNA Nachweis erbracht wurde (Gautam et al. 2021). Bei einer Sensitivität der 16S PCR von 13% lag hier nur eine Spezifität von 88% vor.

Eine PCR Inhibition als möglicher Grund für falsch negative Ergebnisse sowie eine Kontamination oder mangelnde *Orientia*-Spezifität der 16S Ergebnisse als

mögliche Gründe für falsch positive Ergebnisse konnten in diesem Fall ausgeschlossen werden. Da *O. tsutsugamushi* ein intrazelluläres Bakterium ist, stellt Vollblut oder ein Buffy Coat das ideale Probenmaterial dar. Ein Buffy Coat weist dabei eine bessere PCR Detektion durch mehr DNA Extraktion als EDTA Vollblutproben auf, da das Bakterium v.a. in peripheren weißen Blutkörperchen von Patient:innen mit Tsutsugamushifieber sitzt (Vincent 2016; Walsh et al. 2001). Alternativ kann, bei Vorhandensein, eine Escharbiopsie als Probematerial dienen (Lee et al. 2006; Kim et al. 2006a).

In dieser Arbeit fand die DNA-Extraktion aus nur 50 µl Serum statt. Dementsprechend handelte es sich um deutlich weniger Probenvolumen und ein anderes verwendetes Probenmaterial als in anderen Arbeiten. Limitierende Faktoren der vorliegenden Arbeit sind somit die Wahl des Probenmaterials sowie die kleine Anzahl untersuchter Proben, zu denen nur bedingt eine Aussage über die Repräsentativität für die nepalesische Bevölkerung getroffen werden kann. Auch der Probentransport und die Lagerung könnten unter Umständen die Probenqualität kompromittiert haben.

Weiterhin ist unklar, ob bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen dieser Arbeit vor der Blutentnahme eine Antibiose begonnen wurde. Pokhrel et al. stellen fest, dass bei 62% der Patient:innen in Nepal mit unklarem Fieber bereits vor dem Krankenhausaufenthalt ein Antibiotikum eingenommen wurde (Pokhrel et al. 2021). Wenn vor der Blutabnahme eine Antibiose erfolgt, kann dies Einfluss auf das PCR Ergebnis durch Reduktion der PCR Sensitivität nehmen (Kim und Byun 2008; Kim et al. 2016a). Es ist daher wichtig, das Probenmaterial vor oder innerhalb der ersten 3 Tage einer bereits eingeleiteten antibiotischen Therapie zu gewinnen (Kim und Byun 2008). Darüber hinaus fällt die Sensitivität der PCR bei einer Fieberdauer von mehr als 9 Tagen, Grund ist vermutlich die einsetzende Antikörperbildung (Kingston et al. 2015). Es ist nicht dokumentiert, wie lange das Fieber bei den Tsutsugamushifieber-Patient:innen bereits zum Vorstellungszeitpunkt bestand. Aufgrund ihrer diagnostischen Relevanz sollten diese Aspekte in Studien zukünftig berücksichtigt werden.

Bei den Beobachtungen der retrospektiven Studie von Kim et al. wurde die Genauigkeit der Diagnosestellung von Tsutsugamushifieber mittels konventioneller 16S PCR mit anderen Zielstrukturen verglichen. Dazu gehörte u.a. das 47kD Membranproteingen, das mit unterschiedlichen Methoden

konventionell, nested und real time qPCR nachgewiesen wurde (Kim et al. 2016a). Die 16S PCR wies eine Sensitivität von 87% und eine Spezifität 100% auf. Davon unterscheidet sich signifikant die 47kD rt qPCR nach Jiang et al. mit einer Sensitivität von 76%. Die Spezifität betrug 98% (Kim et al. 2016a). Es zeigte sich, dass es zu einer Sensitivitätssteigerung der 16S PCR bis auf 90% kommen kann, wenn zuvor keine Antibiotika eingenommen wurden. Allerdings wird möglicherweise - Studienmodell bedingt - die Sensitivität der 16S qPCR überschätzt. Eine prospektive Kohortenstudie könnte mehr Sicherheit verschaffen (Kim et al. 2016a). Die Autor:innen halten die konventionelle 16S PCR insgesamt für eine einfache, kostengünstige, schnelle, frühe und damit klinisch nützliche Methode mit guter diagnostischer Exaktheit (Kim et al. 2016a). Ein *Orientia* 16S DNA Nachweis scheint aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch nicht spezifisch für akute Tsutsugamushifieber-Fälle zu sein, da ribosomale 16S Sequenzen auch nach einer akuten Infektion bzw. bei einer möglicherweise inapparent latent persistierenden Infektion im Serum gesunder nepalesischer Blutspender:innen nachweisbar sind. Ein positives *Orientia* 16S qPCR Ergebnis ist in dieser Arbeit kein diagnostisches Kriterium für eine akute Tsutsugamushifieber-Infektion, da weder die PCR Positivität noch die Konzentration des Pathogens mit einer akuten Infektion korreliert.

Bei der Nutzung von Buffy Coat aus 5ml EDTA-Blut oder Escharproben konnten Kannan et al. für die 47kD qPCR nach Jiang et al. eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 100% im Vergleich zu serologischen Untersuchungsmethoden wie IgM-IFAT, IgM-ELISA und verschiedenen IgM-Schnelltests feststellen (Kannan et al. 2020; Jiang et al. 2004). Auch andere Studien zeigen eine Spezifität der 47kD von 100% (Tantibhedhyangkul et al. 2017; Kim et al. 2011). Sie eignet sich somit als sensitive und spezifische Methode für die frühe Diagnosestellung einer Tsutsugamushifieber-Infektion in den ersten 7 Tagen nach Krankheitsbeginn (Kannan et al. 2020; John und Varghese 2020; Jiang et al. 2004). Durch den Nachweis des 47kD Gens von *O. tsutsugamushi* nur bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen und dessen Fehlen bei gesunden nepalesischen Blutspender:innen, konnte in der vorliegenden Arbeit erneut die Wertigkeit der 47kD qPCR bei einer akuten Tsutsugamushifieber-Infektion gezeigt werden.

Da *O. tsutsugamushi* insgesamt eine hohe genetische Variabilität aufweist, können molekulare Analysen mit nur einer Zielstruktur bei Inkompatibilität zwischen Zielsequenz und Sonde bzw. Primern falsch negative Ergebnisse liefern (Tantibhedhyangkul et al. 2017). In einer thailändischen Studie ist eine multiplex real time TaqMan qPCR beschrieben, die – unter Nutzung zweier Sonden – 47kD und GroEL als Zielgene kombiniert sowie das humane IFN- β Gen als interne Kontrolle nutzt (Tantibhedhyangkul et al. 2017). Bei einer Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 100% ist diese multiplex qPCR hilfreich bei der Diagnosestellung, wenn unklare IFAT Ergebnisse vorliegen und ermöglicht zudem die Verwendung einer einzelnen Blutprobe. Die Autor:innen halten fest, dass eine Kombination von PCR und Serologie die Tsutsugamushifieber-Diagnostik bei Patient:innen mit unklarem akuten Fieber deutlich verbessert (Tantibhedhyangkul et al. 2017).

Die Zielstrukturen des 16S und des 47kD Gens könnten sich als kombinierte Targets für eine Multiplex PCR zur Tsutsugamushifieber-Diagnostik durchaus eignen. Dabei stellt das ribosomale 16S-Gen ein hoch sensitives, gut konserviertes Target dar. Mit dem Nachweis des 47kD Gens könnte ein Tsustugamushifieber Verdachtsfall als akut bestätigt werden. Das 47kD Gen ist zwar ebenfalls konserviert, weist aber im Vergleich zum ribosomalen 16S Sequenz eine höhere Variabilität auf (Jiang et al. 2013) und läuft dadurch Gefahr bei Mutationen durch mangelnde Primerbindung nicht detektiert zu werden. Mit einer solchen Multitarget PCR ließe sich zwischen einer akuten und einer bereits durchgemacht Infektion besser unterscheiden.

Die Entwicklung und Evaluation von Multitarget PCRs, bei denen mehrere Zielgene gleichzeitig untersucht werden, zur Diagnosestellung einer akuten Tsutsugamushifieber-Erkrankung und zur Unterscheidung von einer bereits durchgemachten Infektion sollten zukünftig an Relevanz gewinnen.

4.2.1. Persistenz von *Orientia*-spezifischer DNA im Organismus

Überraschenderweise wurde in dieser Arbeit in 6/50 (12%) Serumproben gesunder nepalesischer Blutspender:innen DNA von *O. tsutsugamushi* nachgewiesen. Es könnte sich hierbei einerseits um residuale DNA nach einer abgelaufenen und überstandenen Infektion handeln, andererseits könnte dies – auch wenn eine Bestätigung im zweiten Verfahren hier nicht möglich war - ein

Zeichen für eine Persistenz des Bakteriums im Organismus sein. Da es sich bei der untersuchten Gruppe um Blutspender:innen handelte, stellt sich die Frage nach der Möglichkeit einer transfusionsassoziierten *O. tsutsugamushi* Übertragung und Infektion.

In Studien konnte, neben *O. tsutsugamushi* Persistenznachweisen im Mausmodell (Soong et al. 2016), eine Persistenz von *O. tsutsugamushi* im Menschen festgestellt werden. Chung et al. untersuchten 6 Patient:innen mit anhaltenden oder neuen Krankheitszeichen 1-18 Monate nach Diagnosestellung eines akuten Tsutsugamushifiebers mittels PCR oder IFAT, die zu Beginn eine adäquate antibiotische Therapie mit Doxycyclin oder Azithromycin erhalten hatten (Chung et al. 2012). Die verschiedenen Patient:innen wurden vermutlich rückfällig nach der Antibiotikagabe, da sie noch keine ausreichende Immunität entwickelt hatten. Möglicherweise wurde die Antibiose nicht lange genug durchgeführt. Andere zeigten eine verlängerte Genesung, Symptompersistenz wie Schwächegefühl oder neue kardiovaskuläre Ereignisse wie eine Angina pectoris und eine transitorische ischämische Attacke (TIA). In aus Vollblut der 6 Patient:innen angelegten Zellkulturen ließen sich, Monate nach einem symptomatischen Tsutsugamushifieber und der Beendigung der Therapie, lebensfähige *O. tsutsugamushi* Bakterien nachweisen. Eine Sequenzierung ergab verschiedene *Orientia*-Bakterienstämme. *O. tsutsugamushi* kann daher eine chronische latent persistierende Infektion verursachen. Die Antibiose lässt die Symptome abklingen, eliminiert das Bakterium jedoch nicht vollständig (Chung et al. 2012). Auch eine Reaktivierung nach Monaten bis Jahren wurde bereits beschrieben. Koinfektionen wie Leptospirose und eine Immunsuppression z.B. mit Cyclophosphamid (Kock et al. 2018), im Mausmodell auch die spezifische Depletierung von CD8+ Zellen (Hauptmann et al. 2016), stehen im Verdacht diese zu triggern (Chung et al. 2012; Smadel et al. 1952b).

Personen in Tsutsugamushifieber-Endemiegebieten, die ihr Blut spenden, können eine *Orientia*-Bakteriämie aufweisen, bevor sie symptomatisch werden, nach Abklingen der Symptome sowie nach erfolgter Antibiose (Casleton et al. 1998). Es existieren vereinzelte Berichte über *O. tsutsugamushi* Infektionen nach einer Nadelstichverletzung, nach Bluttransfusionen, einer Stammzelltransplantation, sowie ein neonataler Tsutsugamushifieber-Fall nach

diaplazentärer *O. tsutsugamushi* Übertragung (Kang et al. 2010; Poomalar und Rekha 2014). Laut Kwon et al. macht das Tsutsugamushifieber in Südkorea 0,5% (1/193) der transfusionsbedingten Infektionen aus (Kwon et al. 2016).

Im Rahmen der Blutspende dient für gewöhnlich die Anamnese und die routinemäßige Testung auf übertragbare Krankheiten wie HIV, Hepatitisviren und *Treponema pallidum* als Vorsichtsmaßnahme vor transfusionsassoziierten Infektionen (Belanger et al. 2000). *O. tsutsugamushi* wird nicht bei den regelhaft erfassten Erkrankungen im Routinescreening genannt.

Bei der Lagerung von Blutprodukten stellten Casleton et al. bereits fest, dass *O. tsutsugamushi* eine Kühlung von 4°C über 30 Tage oder ein Einfrieren bei einer Temperatur von -70°C für 45 Tage nicht überlebt (Casleton et al. 1998). Eine Vorbehandlung von Blutprodukten wie Erythrozytenkonzentrate, Thrombozytenkonzentrate und Blutplasma mittels Riboflavin (Vitamin B₂) oder Psoralen plus UV Licht Bestrahlung inaktivierte *O. tsutsugamushi* in Mausmodellen, sodass danach kein Nachweis mehr in PCR oder Kultur gelang (Rentas et al. 2007; Belanger et al. 2000). Auch eine Filtration von weißen Blutkörperchen mittels speziellem Leukozyten-Filter entfernte infizierte Zellen aus Blutprodukten und konnte somit im Mausmodell vor einer *O. tsutsugamushi* Infektion schützen (Mettile et al. 2000).

In thailändischen Untersuchungen ergab sich aufgrund erfolgloser kultureller *O. tsutsugamushi* Anzuchtversuche aus Blutprodukten Tsutsugamushifieber-Erkrankter und gesunder Blutspender:innen kein Hinweis für ein großes Übertragungsrisiko des Bakteriums durch kontaminierte Blutprodukte (Khaisuwan et al. 2001). Dabei sollte die Prozessierung und Lagerung der Blutprodukte wie oben beschrieben bereits für eine geringere Überlebensfähigkeit der *Orientia*-Bakterien (Khaisuwan et al. 2001; Casleton et al. 1998). Darüber hinaus ist in Endemiegebieten von einer Seroprävalenz von *Orientia*-spezifischen Antikörpern auszugehen, die vor einer transfusionsassoziierten *O. tsutsugamushi* Infektion schützen können (Bonell et al. 2017; Blacksell et al. 2007b; Sengupta et al. 2015).

Ein Screening von Blutprodukten mittels PCR, wie von Kang et al. in Südkorea vorgeschlagen, sei laut Khaisuwan et al. unpraktikabel, teuer und nicht indiziert (Khaisuwan et al. 2001; Kang et al. 2010). Eine PCR-Testung vor der Gabe von

Blutprodukten könnte allerdings insbesondere bei Immunsupprimierten in Betracht gezogen werden (Kang et al. 2010).

Abschließend kann ein prinzipielles Risiko einer transfusionsassoziierten *O. tsutsugamushi* Übertragung und Infektion nicht vollständig ausgeschlossen werden. Das Fehlen von vielen berichteten transfusionsassoziierten *O. tsutsugamushi* Infektionen in endemischen Regionen ist jedoch ein starkes Indiz dafür, dass das Risiko eher gering ist (Khaisuwan et al. 2001).

4.2.2. Differentialdiagnostischer Ausschluss einer SFTS-Virus-Infektion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Serumproben der akut erkrankten Tsutsugamushifieber-Patient:innen aufgrund der dem Tsutsugamushifieber ähnlichen klinischen Präsentation einer SFTS-Virus-Infektion sowie der in der Literatur berichteten Koinfektionen mit *O. tsutsugamushi* mittels qPCR (Yoshikawa et al. 2014) auf SFTS-Virus-RNA untersucht. Bei fehlendem Nachweis bestand bei den Patient:innen kein Hinweis auf eine Koinfektion von Tsutsugamushifieber mit diesem Virus.

Die in dieser Arbeit verwendete one-step RT qPCR nach Yoshikawa et al. zum Nachweis von SFTS-Virus-spezifischer RNA weist eine hohe Effizienz und Spezifität sowie eine Sensitivität von 38% für unterschiedliche SFTS-Virus-Stämme auf und ist laut Autor:innen zur Detektion einer Infektion mit dem Virus geeignet (Yoshikawa et al. 2014). Als bestes Untersuchungsmedium wird Serum bzw Plasma festgehalten (Yoshikawa et al. 2014), welches hier verwendet wurde. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass lediglich wegen der relativ geringen Sensitivität der verwendeten PCR kein Nachweis erbracht werden konnte. In der Studie von Kim et al 2019 wurde, wie in der vorliegenden Untersuchung, eine Koinfektion mit dem SFTS-Virus bei Tsutsugamushifieber-Patient:innen ausgeschlossen (Kim et al. 2019b). Es gibt allerdings einige Studien, die ein zeitgleiches Auftreten einer SFTS-Virus-Infektion und dem Tsutsugamushifieber beobachten konnten. Nachweise von Koinfektionen mit SFTS-Virus und Tsutsugamushifieber konnten in zahlreichen Patient:innen aus Japan und Südkorea erbracht werden (Satoh et al. 2017; Thi Hai Yen et al. 2019; Wi et al. 2016; Yoo et al. 2018; Kim et al. 2018). Dabei wurde entweder

direkt mittels PCR oder durch serologischen Antikörpernachweis auf SFTS-Virus und *O. tsutsugamushi* getestet.

Die Testung auf SFTS-Virus mittels qPCR oder IFAT IgG-Antikörper bei diagnostizierten Tsutsugamushifieber-Fällen in Südkorea ergab in 4% der Fälle ein positives Ergebnis (Ra et al. 2019). Schnelltest positive südkoreanische Tsutsugamushifieber-Erkrankte hatten in einer weiteren Studie sogar in 23% der Fälle auch einen SFTS-Virus PCR-Nachweis (Wi et al. 2016). Bei 12 SFTS-Virus-Antikörper positiven Patient:innen, wurde bei 83% mittels IFAT IgG-Antikörper gegen *O. tsutsugamushi* nachgewiesen (Thi Hai Yen et al. 2019). Bei mittels rt qPCR nachgewiesenen SFTS-Virus-Erkrankungen erfolgte in 5% der Fälle ebenfalls ein Tsutsugamushifieber-Nachweis (Ra et al. 2019). In Südkorea zeigte die direkte Testung von Serumproben akut Fieberkranker mittels PCR 9 SFTS-Virus-Nachweise und dabei in 33% (3 Proben) der Fälle einen *O. tsutsugamushi* PCR Nachweis (Thi Hai Yen et al. 2019). Ein Fallbericht aus dem Jahr 2017 konnte bei einer Patientin eine gleichzeitige Infektion mit SFTS-Virus und 2 verschiedenen *Orientia*-Genotypen durch PCR Nachweis dokumentieren (Yoo et al. 2018).

Trotz Überschneidungen der klinischen Präsentation der beiden Erkrankungen, lassen sich in einigen Studien Unterschiede observieren. Dabei beobachteten Park et al. bei SFTS-Virus-Infektionen häufiger gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerz), einen Eschar, Exantheme und Kopfschmerzen bei Tsutsugamushifieber-Erkrankten und auffällige Laborparameter wie Leukozytopenie, Thrombozytopenie und ein niedriges CRP (Park et al. 2019). Erniedrigte CRP Werte und eine Leukopenie zeigten sich auch in einer weiteren Arbeit bei einer SFTS-Virus-Infektion (Satoh et al. 2017). In einigen Arbeiten wurden Punktesysteme entwickelt, die bei der Diagnosestellung einer SFTS-Virus-Infektion in Tsutsugamushifieber-Endemiegebieten und zur Unterscheidung von anderen Zoonosen helfen sollen (Park et al. 2019; Heo et al. 2020; Kim et al. 2018). Dabei fließen in diesen Studien neurologische Symptome, eine Leukopenie, Gerinnungsstörungen mit verlängerter aPTT, Diarrhoe und ein normales CRP in die Bewertung als unabhängige Prädiktoren für eine SFTS-Virus-Infektion ein (Kim et al. 2018; Heo et al. 2020). Heo et al. zeigen für ihren entwickelten Score eine Sensitivität von 83% und Spezifität von 96% (Heo et al. 2020).

In Nepal wurde bisher noch keine SFTS-Virus-Infektion dokumentiert. In dieser Arbeit wurden das erste Mal nepalesische Tsutsugamushifieber-Patient:innen auf SFTS-Viren untersucht, dabei konnte keine Infektion mit dem Virus beobachtet werden.

Da Nepal mit endemischem Tsutsugamushifieber eine gewisse geographische Nähe zu den Ländern China, Nordkorea, Südkorea und Japan mit SFTS-Virus-Vorkommen besitzt (Liu et al. 2014), sowie aufgrund der ähnlichen klinischen Präsentation beider Krankheitsbilder - trotz einiger existierender Unterschiede - sollte die SFTS-Virus-Infektion weiterhin als prinzipiell mögliche Differentialdiagnose und Koinfektion in Betracht gezogen werden (Satoh et al. 2017). Vor dem Hintergrund begrenzter diagnostischer Ressourcen in Nepal können dabei klinische Scores zur Diagnosestellung nützlich sein (Park et al. 2019; Heo et al. 2020; Kim et al. 2018). Ra et al. schlagen darüber hinaus bei SFTS-Virus-Erkrankten in Tsutsugamushifieber-Endemiegebieten eine empirische Antibiose vor (Ra et al. 2019).

4.3. Diversität von *O. tsutsugamushi* in Nepal

Die der Amplifikation der VD I des 56kD Membranproteingens dienende PCR (Mahajan et al. 2006) ergab bei 9 der 10 zuvor 16S qPCR positiven Proben der nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen ein positives Ergebnis. Ein Nachweis von 56kD Sequenzen in den zuvor mittels 16S qPCR positiv getesteten gesunden nepalesischen Blutspender:innen gelang nicht.

Gautam et al. stellten bei ihrer molekularen Charakterisierung von *O. tsutsugamushi* in Nepal fest, dass die von ihnen untersuchten nepalesischen Stammsequenzen zusammen clustern und dies zudem weit entfernt von anderen asiatischen *Orientia*-Stämmen (Gautam et al. 2021). Diese Beobachtung konnten in dieser Arbeit nicht gemacht werden. Stattdessen konnten in der Typisierung Homologien zu verschiedensten bekannten asiatischen *Orientia*-Stämmen nachgewiesen werden. Ein neuer *Orientia*-Stamm wurde nicht detektiert. Auch kristallisierte sich kein einzelner prädominanter Stamm heraus. Eine Assoziation zwischen den detektierten Sequenzen und den beiden Orten der Probensammlung konnte in der phylogenetischen Stammbaumanalyse nicht beobachtet werden. Eine begrenzte Anzahl und zwei Orte der Probenauswahl lassen jedoch Raum zur

Diskussion, ob hier eine Form von Repräsentativität für Nepal erreicht wurde. In einer Studie aus Sri Lanka wurden ebenfalls wenige Patient:innen-Proben von 2 verschiedenen Orten phylogenetisch mittels 56kD PCR untersucht, die wie bei der vorliegenden Arbeit eine große genetische Vielfalt aufwiesen (Premaratna et al. 2017).

Phylogenetische Analysen, basierend auf partiellen 56kD Gensequenzen, können je nach untersuchter VD Sequenz unterschiedliche Stammbäume ergeben (Nakayama et al. 2010), die zu Fehlschlüssen von Stammverwandtschaften führen (Phetsouvanh et al. 2015). Verschiedene Autor:innen empfehlen daher die Durchführung der 56kD PCR über den vollständigen *open reading frame* des 56kD TSA Gens mit anschließender Sequenzierung, um klare *Orientia*-Genotypen zu definieren und abzugrenzen (Lu et al. 2010; Kim et al. 2017). In dieser Arbeit wurde nur die VD I untersucht, eine auf VD II-IV ausgeweiterte Untersuchung gelang in dieser Arbeit leider nicht, da vermutlich die – in der Studie nicht angegebene – Sensitivität der dafür verwendeten 56kD PCR nach Lu et al. für die Proben nicht ausreichte (Lu et al. 2010). Eine Erweiterung der Sequenzierung um die VD II-IV könnte weiteren Aufschluss zu Stammähnlichkeiten in Nepal bieten.

Im endemischen Setting wurde in diversen Studien eine eher niedrige Sensitivität und eine sehr hohe Spezifität der konventionellen 56kD PCR nach Mahajan et al. im Vergleich zur IFAT (IgM und IgG) beobachtet (Mahajan et al. 2006). Parola et al. nennen eine niedrige Sensitivität von 18% (Parola et al. 2008) und die Arbeit von Kim et al. zeigt eine Sensitivität von nur 8% und eine Spezifität 100% (Kim et al. 2016a). Kannan et al. stellen für die 56kD PCR eine etwas höhere Sensitivität von 75% und eine Spezifität von 100% fest (Kannan et al. 2020; Mahajan et al. 2006). Obwohl die Primer in sehr konservierten Regionen liegen, kann eine Nichtübereinstimmung dieser durch die hohe Variabilität des 56kD Membranproteingens bedingt sein (Sonthayanon et al. 2006; Tantibhedhyangkul et al. 2017).

In der Untersuchung von Ruang-Areerate et al. deckte die 56kD PCR drei variable Domänen der insgesamt vier bekannten ab (Ruang-Areerate et al. 2011). Auch andere Studien untersuchten VD I-III durch eine überlappende Anordnung der amplifizierten Fragmente (Varghese et al. 2015). Die in 6 thailändischen Provinzen akquirierten Proben ergaben kein Cluster eines

Orientia-Genotyps am gleichen Ort (Ruang-Areerate et al. 2011). Phylogenetische Analysen des gesamten *open reading frames* des 56kD Gens von Proben zweier Standorte in Thailand beobachteten ein Clustern bei der Mehrheit der Isolate um *Orientia* Karp ähnliche Stämme (Blacksell et al. 2008). Dies passt zur vorbeschriebenen 40-50% Prädominanz des *Orientia* Karp Stammes aus Japan, Südkorea, China und Taiwan (Kelly et al. 2009; Lu et al. 2010). Häufig waren in der thailändischen Analyse auch Stämme vom Gilliam Typ sowie einzelne Proben mit TA716 und TA763 Stämmen (Blacksell et al. 2008). Insgesamt zeigt die Studienlage eine große genetische Diversität der gefundenen *O. tsutsugamushi* Isolate mit Ähnlichkeiten zu in anderen Ländern gefundenen *Orientia*-Stämmen (Blacksell et al. 2008; Lu et al. 2010; Varghese et al. 2015; Ruang-Areerate et al. 2011).

Es bleibt festzuhalten, dass nepalesische *Orientia*-Stämme äußerst divers sind und Übereinstimmungen mit dem Stammvorkommen vieler anderer asiatischer Länder haben. Obwohl in Nepal *O. tsutsugamushi* Nachweise in Nagetieren und Milben existieren (Dhimal et al. 2021; Karki et al. 2017), sind diese spärlich und wurden bislang noch nicht molekular charakterisiert. Möglicherweise ist in Nepal das *Orientia*-Vorkommen in Milben noch diverser als hier in den humanen Proben beobachtet und es werden nur bestimmte – für den Menschen besonders pathogene – *Orientia*-Stämme übertragen.

Die genetische Diversität von *O. tsutsugamushi* ist vermutlich auf häufige Punktmutationen und genetische Rekombination u.a. im 56kD TSA Gen zurückzuführen (Kim et al. 2017; Phetsouvanh et al. 2015). Geographisches Clustern spezifischer Sequenztypen lässt auf die Diversifikation von *O. tsutsugamushi* vornehmlich durch Rekombination anstatt durch Mutation schließen (Phetsouvanh et al. 2015). Möglicherweise kommt es durch Koinfektionen mit multiplen Stämmen im Milben- oder Nagerreservoir zur genetischen Rekombination der Genotypen. Nahezu gleiche und identische Genotypen in geographisch entfernten Ländern lassen darüber hinaus eine Migration von *O. tsutsugamushi* vermuten. Beispielsweise konnten Unterschiede von nur 1-2 Basen bei *Orientia*-Sequenzen aus Südkorea und Taiwan ausgemacht werden (Kim et al. 2017). Da die Milben sich nicht selbst weit fortbewegen können, ist die Verbreitung des Erregers über Nagetiere und Vögel wie bei anderen Infektionskrankheiten die plausibelste Annahme. Die

geographische Fluktuation der Vektor-Spezies könnte die genetische Rekombination der Bakterien Genotypen fördern (Kim et al. 2017).

Die Genotypisierung eines kleinen Fragments ist oft nicht ausreichend, um Unterschiede zwischen den Stämmen zu identifizieren, da genetische Rekombination an multiplen Stellen passiert (Kim et al. 2017). Vereinzelt wird auch die Meinung vertreten, dass sich das 56kD Membranprotein eher für die Untersuchung von lokalen Ausbrüchen und weniger zur phylogenetischen Abgrenzung einzelner *Orientia*-Stämme eignet, begründet in der Rekombination und dem hohen Selektionsdruck des Gens durch das Immunsystem des Wirts (Sonthayanon et al. 2010).

Um Fehlschlüssen zu Stammverwandtschaften aufgrund von genetischer Rekombination zu entgehen, schlägt Phetsouvanh et al. die Methode der Multi Locus-Sequenztypisierung (*multi locus sequencing*) vor. Es nutzt gut konservierte Haushaltsgene von *O. tsutsugamushi* z.B. die *housekeeping* Gene *gyrB* (DNA Gyrase Untereinheit B) oder *mdh* (Malat Dehydrogenase), um den Nachteilen eines einzelnen Oberflächenprotein-Genmarkers zu entgehen (Phetsouvanh et al. 2015; Nakayama et al. 2010). Dabei weist beispielweise das *mdh*-Gen 2 Sequenzfragmente auf, mit Produktlängen der Amplifikate von 608bp und 348bp (Phetsouvanh et al. 2015).

Eine weitere Alternative zur Untersuchung der phylogenetischen Verwandtschaft stellt das *whole genome sequencing* dar. *O. tsutsugamushi* hat ein Genom mit extrem vielen repetitiven Sequenzen. Die Assemblierung des Genoms aus den Sequenz-Fragmenten war wegen der hohen Ähnlichkeiten dieser repetitiven Sequenzen bislang ungewöhnlich schwierig. Über *long-read* Bibliotheken gelang dann die vollständige Genomsequenzierung (Batty et al. 2018; Cho et al. 2007; Nakayama et al. 2008). Das *single molecule long read sequencing* des gesamten *Orientia*-Genoms zeigt ein kleines Kerngenom mit 657 universell konservierten Genen angeordnet in kleinen Inseln, dazwischen die repetitiven Sequenzen (Batty et al. 2018). Die Autor:innen halten diese Sequenzierungsmethode sinnvoll für Untersuchungen komplexer Genome und deren Variationen, wie sie bei *O. tsutsugamushi* vorkommen. Es wurde festgestellt, dass sich diese Sequenzierungsmethode auch für klinische Proben eignet (Elliott et al. 2021).

Das Wissen über das *Orientia*-Stammvorkommen in Nepal ist relevant für die geeignete Auswahl immundominanter Antigene in der Diagnostik und möglicher Impfstoffkandidaten. Dafür eignet sich weiterhin das 56kD TSA kodierende Gen, gegen dessen Antigen die Immunantwort im Menschen gebildet wird. Die Beobachtung von dominierenden Vektor-Spezies und Prävalenzen von unterschiedlichen *Orientia*-Genotypen in Endemiegebieten wie Nepal sind daher essentiell, um epidemiologische Veränderungen des Tsutsugamushiefiebers zu erkennen und um die Diagnostik sowie die Impfstoffentwicklung zu verbessern (Kim et al. 2017; Ruang-Areerate et al. 2011).

4.4. Klinische Charakteristik von nepalesischen Tsutsugamushiefieber-Patient:innen

In Nepal wurden bereits in mehreren Studien häufig auftretende Symptome bei Tsutsugamushiefieber erkrankten Kindern und Erwachsenen untersucht.

Fieber zeigten dabei fast alle Tsutsugamushiefieber kranken Kinder und Erwachsene mit nahezu 100% (Bajracharya 2020; Ghimire et al. 2020; Pokhrel et al. 2021; Thapa et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte Fieber bei 80,5% der Patient:innen beobachtet werden. Ein subjektives Hitzegefühl wurde signifikant häufiger bei einer 16S qPCR positiven Testung angegeben.

Zu den häufigen Symptomen gehören v.a. gastrointestinale Beschwerden mit Bauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen (Bajracharya 2020). In dieser Arbeit litten 73% an Übelkeit. In der Literatur schwanken die Angaben zu Übelkeit zwischen 26% und 60% (Bhandari et al. 2021; Pathak et al. 2019). 57% hatten Erbrechen und Bauchschmerzen. Dies entspricht der Studienlage in Nepal mit Zahlen von 60% und 58% (Bhandari et al. 2021; Pathak et al. 2019). Diarrhoe zeigten mit 31% der Tsutsugamushiefieber-Patient:innen deutlich mehr als bei Pokhrel et al. mit 3% dokumentiert (Pokhrel et al. 2021). Bei den Patient:innen der vorliegenden Arbeit lag Diarrhoe signifikant öfter bei einem 16S qPCR positiven Nachweis vor.

Oft wird auch eine Leberbeteiligung beobachtet (Bajracharya 2020; Varghese et al. 2013). Eine Leberbeteiligung mit Hepatomegalie wurde bei Kindern in 47% der Fälle beobachtet und ist damit häufiger als bei Erwachsenen (Pathak et al. 2019; Pokhrel et al. 2021). Die Zahlen zu Ikterus schwanken zwischen 4 und

26% (Bhandari et al. 2021; Pathak et al. 2019; Thapa et al. 2020). In der Arbeit hier wurde bei 10% eine vergrößerte Leber getastet und bei 12% ein Ikterus gesehen. Dies passt zu den Zahlen aus der Literatur.

Eine Lymphadenopathie gehört ebenfalls zu den häufigen klinischen Symptomen (Bajracharya 2020). Zahlen zu vergrößerte Lymphknoten schwanken stark von 2-60% (Bhandari et al. 2021; Pathak et al. 2019; Pokhrel et al. 2021; Thapa et al. 2020). Mit 30% Lymphadenopathie bei den Patient:innen der vorliegenden Arbeit liegt diese Beobachtung im Rahmen der nepalesischen Studienlage. Darüber hinaus waren in dieser Arbeit vergrößerte Lymphknoten der Leiste bei den 16S qPCR positiven Tsutsugamushifieber-Patient:innen signifikant häufiger zu finden. Die Lokalisation in den Leisten gibt zusätzlich einen Hinweis auf die Eintrittspforte des Erregers über die unteren Extremitäten.

In dieser Arbeit gaben 66% der Patient:innen Kopfschmerzen an. Kopfschmerzen gehören mit bis zu 83% zu den häufigsten Symptomen (Bajracharya 2020; Bhandari et al. 2021; Ghimire et al. 2020; Pathak et al. 2019; Pokhrel et al. 2021; Thapa et al. 2020).

Die in dieser Studie Untersuchten hatten deutlich weniger Gliederschmerzen (9%) im Vergleich zu einer anderen Studie (87%) (Ghimire et al. 2020).

Ebenfalls kann der pathognomonische Eschar in der körperlichen Untersuchung gesehen werden (Bajracharya 2020). Die Angaben zum Eschar bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Kranken schwanken von 0-26% (Murdoch et al. 2004; Gautam et al. 2019; Chapagain et al. 2020; Thapa et al. 2020; Pokhrel et al. 2021; Bhandari et al. 2021; Pathak et al. 2019; Ghimire et al. 2020; Bajracharya 2020). Eine Studie aus Indien berichtet von einem Eschar in 55% der Fälle (Varghese et al. 2013), eine südkoreanische Studie berichtet sogar von 92% Escharvorkommen (Kim et al. 2007), insgesamt schwanken die Zahlen stark. Passend zu den existierenden nepalesischen Daten, konnte hier bei 16% der Untersuchten ein Eschar gefunden werden. Die Zahlen unterstützen somit die Forderung von Chapagain et al., dass – trotz der Abwesenheit eines pathognomonischen Eschars – Tsutsugamushifieber bei unklarem Fieber in Betracht gezogen werden sollte (Chapagain et al. 2020).

Anamnestic Angaben zu den Risikofaktoren Tierkontakt und Aktivität im Freien bei fast allen Tsutsugamushifieber-Patient:innen (96%) spiegeln diese in

der Literatur festgehaltenen Risiken auch bei nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen wieder (Elliott et al. 2019).

Insgesamt wurde die Spezifität der hier untersuchten klinischen Zeichen im Vergleich mit anderen fieberhaften Erkrankungen nicht eruiert. Um eine genauere Aussage über Organdysfunktionen machen zu können, sollten zukünftig laborchemische Untersuchungen gemacht werden.

Bei den häufig auftretenden Symptomen wie Fieber, gastrointestinale Beschwerden, Kopfschmerzen und Lymphadenopathie sollte an Tsutsugamushifieber gedacht werden (Bajracharya 2020). In dieser Studie konnte bei Durchfall, subjektivem Hitzegefühl und vergrößerten Leistenlymphknoten signifikant häufiger einen positive *Orientia* 16S qPCR Nachweis verzeichnet werden. Bei Auftreten dieser Symptome sollte der hohe klinische Verdacht einer Tsutsugamushifieber-Infektion bestehen. Möglicherweise ist die PCR auch ein Indikator für Infektionen mit schwereren Verläufen, da ihre Positivität als Zeichen bereits durch den Organismus zirkulierender *Orientia*-DNA betrachtet werden kann. Einen Hinweis darauf geben auch Studien aus Thailand und Südkorea, die eine Assoziation der *O. tsutsugamushi* DNA-Last und der Krankheitsschwere anhand der Letalität feststellen konnten (Sonthayanon et al. 2009; Kim et al. 2021).

Bei Betrachtung der IFAT und PCR Ergebnisse dieser Arbeit sowie der klinischen Präsentation unter Berücksichtigung der Fallklassifikationen der EDCD Nepal (Epidemiology and Disease Control Division 2015) zeigt sich, dass die nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen dieser Arbeit die Klassifikationskriterien nicht vollständig erfüllen. Unklar ist, wie lange das akute Fieber bereits bestand, ein Eschar lag nur bei 16% der Untersuchten vor. Auch konnte mittels IFAT bei 46% ein IgM-Antikörperrnachweis erbracht werden. Gepaarte Serumproben lagen nicht vor. Darüber hinaus gelang nur bei 13% ein direkter *Orientia*-Nachweis mittels PCR aus Serum Probenmaterial, nicht aus Vollblut oder einer Escharbiopsie. Der Einsatz von Schnelltests zur Falldefinition dieser Klassifikation spielt bislang keine Rolle (Epidemiology and Disease Control Division 2015). Vor dem Hintergrund der hier gemachten Beobachtungen bezüglich der hohen Sensitivität des Schnelltest, sollte dieser zukünftig bei einer Falldefinition möglicherweise verstärkt berücksichtigt werden. Derzeit scheint kein einzelner Labortest ausreichend sensitiv und

spezifisch zu sein, um die Diagnose mit hinreichender Sicherheit stellen zu können. Die Beurteilung von Symptomatik und Laborparametern im klinischen Gesamtzusammenhang ist weiterhin für eine adäquate gesundheitliche Versorgung entscheidend. Festzuhalten ist, dass die Definition eines Tsutsugamushifieber-Falls eine Herausforderung bleibt.

4.5. Inflammatorische Immunantwort von nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen

Bei einer akuten Tsutsugamushifieber-Infektion wurde in klinischen Studien in 100% der Fälle erhöhte IL-10 Konzentrationen gefunden, 89% der untersuchten Seren wiesen erhöhte Konzentrationen von TNF- α und 44% erhöhte Konzentrationen von IFN- γ auf (Iwasaki et al. 2010). Auch Kramme et al. beobachteten signifikant höhere IFN- γ und IL-10 Konzentrationen in den ersten 10 Tagen nach Infektion als bei Genesung (Kramme et al. 2009). Verschiedene Autor:innen haben IL-6 Zytokinantworten bereits untersucht. Dabei konnte in einer Arbeit eine höhere Genexpression für IL-6 observiert werden (Chung et al. 2007). Eine andere Studie wies bei akuten Tsutsugamushifieber-Fällen signifikant erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen im Vergleich zu asymptomatischen Kontrollen nach (Bora und Khan 2019).

In den hier gemachten Untersuchungen ließen sich ebenfalls Unterschiede der Entzündungsreaktion verzeichnen: Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN- γ wiesen signifikant höhere Konzentrationen bei den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen, verglichen mit den gesunden nepalesischen Blutspender:innen, auf. Dabei scheint der positive IgM-Antikörpernachweis in der IFAT assoziiert mit den signifikant höheren IFN- γ Konzentrationen bei der nepalesischen Fallgruppe im Vergleich zu der nepalesischen Kontrollgruppe zu sein. Daraus lassen sich Hinweise auf eine Aktivierung von Lymphozyten und des angeborenen Immunsystems bei den akut Erkrankten ableiten.

Bei einer regulären Tsutsugamushifieber-Infektion sorgt die Stimulation von IL-10 Produktion durch *O. tsutsugamushi* für ein längeres Überleben der Bakterien im befallenen Organismus, da das IL-10 die TNF- α und IL-6 Produktion und Freisetzung inhibiert (Díaz et al. 2018; Kim et al. 2006b). Ein Hinweis für ein besseres Überleben der Bakterien ist eine höhere *O. tsutsugamushi* DNA-Last,

die sich bei hohen IL-10 Konzentrationen mittels PCR in Vollblut nachweisen lässt (Kramme et al. 2009). In dieser Arbeit konnten in den Seren keine signifikanten Unterschiede der *O. tsutsugamushi* DNA Last sowie keine signifikanten Unterschiede der IL-10 Konzentrationen zwischen den Studiengruppen festgestellt werden, wobei festzuhalten bleibt, dass der Großteil der IL-10 Konzentrationen der nepalesischen Kontrollgruppe unter der Nachweisgrenze lag. Milde Erkrankungsfälle könnten ein möglicher Grund sein. In dieser Arbeit konnte für den Entzündungsmarker TNF- α kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen beobachtet werden. Es wurde bereits gezeigt, dass es keine signifikanten TNF- α Konzentrationsunterschiede zwischen einer akuten Infektion in den ersten 10 Tagen und bei Genesung gibt (Kramme et al. 2009). Inwieweit aber diese Beobachtung von Kramme et al. als Erklärungsansatz für die nicht signifikanten TNF- α Konzentrationsunterschiede in der vorliegenden Arbeit übertragbar sind, lässt sich hier nicht abschließend beantworten, selbst wenn man die nepalesische Kontrollgruppe mit einem *Orientia*-spezifischen IgG-Antikörpernachweis als Genesengruppe bzw. als latent persistierenden Infizierte betrachtet. Für TNF- α gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass das Zytokin ein Marker für die Schwere und Letalität einer Tsutsugamushifieber-Erkrankung darstellt (Kim et al. 2019a). Insgesamt sprechen allerdings die hier gemachten Beobachtungen für eine eher schwache inflammatorische Immunantwort mit Hinweis auf eine nur leichte Erkrankung. Iwasaki et al. verzeichneten zudem niedrigere Zytokinkonzentrationen nach einer Antibiose mit Tetracyclin (Iwasaki et al. 2010), Chung et al. mit Doxycyclin (Chung et al. 2007). Da in dieser Arbeit die Antibiotikaeinnahme vor Probennahme unklar ist, bleibt fraglich, ob diese einen Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen hatte. Limitierend ist insbesondere die fehlende Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Zytokinkonzentrationen zur Differenzierung dieser in der akuten Phase der Infektion und der Rekonvaleszenzphase.

4.6. Schlussfolgerung

Werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst betrachtet, spricht der bei Asymptomatischen untersuchte *Orientia*-Serostatus dafür, dass das Tsutsugamushifieber in der gesunden nepalesischen Bevölkerung zu einem hohen Grad endemisch ist. Vor dem Hintergrund limitierter Ressourcen in Nepal stellte sich der Einsatz von Schnelltests zur akkuraten Diagnosestellung einer akuten Tsutsugamushifieber-Infektion prinzipiell als geeignet dar. Sie erweisen sich als deutlich sensitiver als die ohnehin sehr aufwendige IFAT. Allerdings konnte die Spezifität nur eingeschränkt beurteilt werden. Möglicherweise sollte die IFAT als diagnostischer Goldstandard in Zukunft durch sie abgelöst werden. Weiterhin wurde der Nachweis von *Orientia* 16S DNA ohne Konzentrationsunterschiede zu akut Erkrankten bei asymptomatischen Blutspender:innen erbracht, der angesichts einer hohen Prävalenz von IgG-Antikörpern einen Hinweis auf eine Persistenz nach einer akuten Tsutsugamushifieber-Infektion gibt. 16S DNA Nachweise in beiden Gruppen alleine sind vor diesem Hintergrund kein Beleg für eine akute Infektion. Für den direkten, diagnostischen *O. tsutsugamushi* Nachweis könnten sich daher Multitarget PCRs mit mehreren Zielstrukturen eignen, z.B. das hoch sensitive Target des 16S-Gens und das 47kD Gen, welches einen Fall als akut bestätigen könnte. Damit ließe sich zwischen einer akuten und einer bereits durchgemachten Infektion diskriminieren. Der Hinweis auf eine *Orientia* 16S Persistenz in der gesunden nepalesischen Bevölkerung nach Tsutsugamushifieber-Infektion sollte zum Zweck eines besseren Verständnisses der Pathogenese weiter evaluiert werden. Insgesamt könnte es für eine optimierte Diagnostik in allen Phasen der Erkrankung sinnvoll sein, serologische und molekulare Verfahren in Form von Schnelltests und Multitarget PCR miteinander zu kombinieren.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine überraschende Diversität von in Nepal endemischen *Orientia*-Stämmen beschrieben, die im 56kD Gen große Homologien zu anderen asiatischen *Orientia*-Stämmen aufwiesen. Ein geographisches Clustering, neue Stämme oder ein prädominanter Stamm wurden nicht beobachtet. Die Typisierung sollte durch eine höhere Anzahl an Proben und die Wahl größerer, möglichst vollständiger Sequenzen erweitert

werden, um noch genauere Informationen zur *Orientia*-Stammdiversität in Nepal erlangen.

Auch wenn in der hier untersuchten Kohorte kein Hinweis auf Koinfektionen mit dem SFTS-Virus gefunden wurde, sollte dies nicht zu einer generellen Vernachlässigung dieser Differentialdiagnose zum Tsutsugamushifieber in Nepal führen.

Die Untersuchung der systemischen Immunantwort zeigte bei den Zytokinen IL-6 und IFN- γ signifikante Unterschiede zwischen der nepalesischen Fall- und Kontrollgruppe. Daraus lassen sich Hinweise auf eine Aktivierung von Lymphozyten und des angeborenen Immunsystems ableiten. Die Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im Serum waren in dieser Studie jedoch nicht erhöht. Dies spricht für eine schwache inflammatorische Immunantwort mit Hinweis auf eine möglicherweise nur leichte Erkrankung.

Auch die klinische Präsentation nepalesischer Tsutsugamushifieber-Kranker scheint insgesamt vergleichbar mit den bekannten Literaturangaben. Subjektives Hitzegefühl, Diarrhoe und vergrößerte Leistenlymphknoten könnten wichtige Anhaltspunkte zur Unterstützung einer klinischen Verdachtsdiagnose mit anschließender Einleitung einer empirischen Antibiose sein.

Bei der Betrachtung all dessen ist es wichtig, die Limitationen bezüglich der Repräsentativität für die nepalesische Population zu berücksichtigen, die sich durch die kleine getestete Probenzahl, die Wahl des Probenmaterials sowie durch die fehlenden anamnestischen Angaben zu eingenommener Antibiose und Fieberdauer ergeben.

Zusammenfassend stellt sich das Tsutsugamushifieber in Nepal als ein deutliches Gesundheitsproblem dar. Die limitierten diagnostischen Ressourcen, das Fehlen einer breiten öffentlichen Aufmerksamkeit für die Krankheit im Land und die Stammdiversität von *O. tsutsugamushi*, machen Diagnosestellung und Etablierung einer präzisen diagnostischen Infrastruktur für Nepal, sowie die Behandlung zu einer Herausforderung. In zukünftigen Studien sollten Ansätze für die Auswahl geeigneter Zielstrukturen in der Diagnostik näher beleuchtet werden.

5. Zusammenfassung

Orientia (*O.*) *tsutsugamushi*, ein obligat intrazelluläres Gram-negatives Bakterium, wird durch Bisse von Milbenlarven übertragen und verursacht das Tsutsugamushifieber. Das im Zentrum des asiatischen Endemiegebiets liegende Land Nepal ist in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der Forschung zum Tsutsugamushifieber gerückt. Die Epidemiologie dieser vernachlässigten, aufstrebenden Infektionskrankheit in Nepal wurde bislang vornehmlich anhand von Fieberstudien beschrieben. Daten zur *Orientia*-spezifischen Immunantwort in der gesunden nepalesischen Bevölkerung, insbesondere zur Seroprävalenz von Antikörpern, existierten bisher noch nicht. Fragen zu *Orientia*-Persistenz und Koinfektionen mit dem „Schweres Fieber mit Thrombozytopenie-Syndrom“ (SFTS)-Virus waren unbeantwortet. Zudem war *O. tsutsugamushi* in Nepal bis jetzt nur spärlich molekular charakterisiert.

Um ein vertieftes Verständnis der Erkrankung in Nepal zu erlangen, wurde in dieser Dissertation das erste Mal in einer gesunden nepalesischen Population die *Orientia*-spezifische IgM- und IgG-Antikörperantwort sowie das systemische Zytokinprofil mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFAT) bzw. Multiplex-Immunoassay charakterisiert und mit akut Erkrankten, im Schnelltest positiven Tsutsugamushifieber-Patient:innen in Nepal verglichen. Weiterhin wurden Serumproben aus beiden Gruppen auf zirkulierende *Orientia*-DNA mittels PCR untersucht. Es schloss sich eine molekulare Typisierung und phylogenetische Analyse humanpathogener *Orientia*-Sequenzen aus Nepal an.

Die vorliegende Dissertation zeigte, dass sich der Einsatz von Schnelltests zur akkuraten Diagnosestellung eines akuten Tsutsugamushfiebers bei eingeschränkter Beurteilbarkeit deren Spezifität als deutlich sensitiver als die IFAT erwies und dieses aufwendige Verfahren möglicherweise als Goldstandard aufgegeben werden sollte.

In dieser Arbeit konnte erstmals eine hohe Seroprävalenz *Orientia*-spezifischer Antikörper in der gesunden nepalesischen Population identifiziert und in diesem Zusammenhang das endemische Vorkommen der Erkrankung in Nepal genauer charakterisieren werden: Das Tsustugamushifieber ist zu einem hohen Grad endemisch in der nepalesischen Bevölkerung.

Darüber hinaus wurde der Nachweis von *Orientia* 16S DNA bei asymptomatischen Blutspender:innen erbracht, der angesichts einer hohen Prävalenz von IgG-Antikörpern einen zusätzlichen Hinweis auf eine Persistenz des Erregers im Organismus, auch nach einer akuten Tsutsugamushifieber-Infektion, gibt. Auf Basis dieser Erkenntnisse zeigte sich, dass alleinige *Orientia* 16S DNA Nachweise zwar hoch sensitiv, jedoch nicht beweisend für eine akute Infektion sind. Perspektivisch könnten Multitarget PCRs mit der zusätzlichen Zielstruktur des 47kD Gens im endemischen Setting Nepals zur diagnostischen Diskriminierung einer akuten von einer vorangegangenen Infektion beitragen. Des Weiteren konnte ein diverses *Orientia*-Stammvorkommen in Nepal mit großen Homologien zu anderen asiatischen *Orientia*-Stämmen beschrieben werden. Zusätzlich ergab sich in dieser Arbeit kein Hinweis auf SFTS-Virus-Infektionen.

Weiterhin zeigte sich, dass das systemische Zytokinprofil von IL-6 und IFN- γ teilweise signifikante Unterschiede zwischen den nepalesischen Tsutsugamushifieber-Patient:innen und den gesunden nepalesischen Blutspender:innen aufwies, aus der sich Hinweise auf eine Aktivierung von Lymphozyten und des angeborenen Immunsystems ableiten lassen. Bei TNF- α und IL-10 ergaben sich Hinweise auf eine schwache inflammatorische Immunantwort und damit auf eine möglicherweise nur leichte Erkrankung.

Das Beleuchten der klinischen Charakteristik gab Anhaltspunkte zur Unterstützung einer klinischen Verdachtsdiagnose anhand des Vorliegens bestimmter Symptome wie subjektives Hitzegefühl, Diarrhoe und vergrößerte Leistenlymphknoten.

Die vorliegende Arbeit liefert detailliertere Daten zur Seroprävalenz *Orientia*-spezifischer Antikörper und zur Entzündungsantwort in der nepalesischen Bevölkerung, ebenso wie zu geeigneten molekularen diagnostischen Targets und zur Heterogenität von *O. tsutsugamushi* in Nepal. Diese Daten geben neue Hinweise für ein verbessertes Verständnis der Erkrankung sowie zur Etablierung geeigneter und präziser Diagnostik in Nepal. Sie können darüber hinaus einen Beitrag zur Verbesserung der Krankheitsbehandlung, zur verbesserten Kontrolle der Tsutsugamushifieber-Infektionen und zur möglichen Entwicklung eines passenden Impfstoffes für Nepal leisten.

6. Summary

Orientia tsutsugamushi is an obligate intracellular Gram-negative bacterium transmitted by bites from mite larvae and the causative agent of Tsutsugamushi fever, a disease also known as “Scrub Typhus”. Nepal, a country located in the center of the Asian endemic area, has been the focus of increased research on Tsutsugamushi fever in recent years. The epidemiology of this neglected emerging infectious disease in Nepal has been described primarily from fever studies. Data on *Orientia*-specific immune response in the healthy Nepalese population, and in particular on seroprevalence of antibodies does not currently exist. This leaves unanswered questions regarding *Orientia* persistence and co-infection with severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS) virus, as well as sparse molecular characterization of *Orientia tsutsugamushi* in Nepal.

To gain a deeper understanding of the disease in Nepal, this research represents the first characterization of the *Orientia*-specific IgM and IgG antibody response, by indirect immunofluorescence (IFAT), and systemic cytokine profile using multiplex immunoassay, in a healthy Nepalese population as compared to acutely ill, rapid test positive Tsutsugamushi fever patients. Additionally, serum samples from both groups were analyzed for circulating *Orientia* DNA by polymerase chain reaction (PCR). This was followed by molecular typing and phylogenetic analysis of human pathogenic *Orientia* sequences from Nepal.

This approach showed that the use of rapid tests for diagnosis of acute Tsutsugamushi fever was accurate. Furthermore, despite limited ability to assess their specificity, rapid tests proved to be significantly more sensitive than IFAT, suggesting the field should consider abandoning this laborious procedure as the gold standard.

This work is also the first to identify a high seroprevalence of *Orientia*-specific antibodies in the healthy Nepalese population and, in this context, to characterize more precisely the endemic occurrence of the disease in Nepal. This research demonstrates that Tsutsugamushi fever is highly endemic in the Nepalese community.

Furthermore, the detection of *Orientia* 16S DNA in asymptomatic blood donors provides additional evidence for persistence of the pathogen in the organism even after acute Tsutsugamushi fever infection, given the high prevalence of

IgG antibodies. Based on these findings, *Orientia* 16S DNA detections alone were shown to be highly sensitive but not indicative of acute infection. As such, multi-target PCRs with the additional target of the 47kD gene in an endemic setting like Nepal could contribute to the diagnostic discrimination of acute from previous infections.

The analysis allowed for the description of a diverse *Orientia* strain occurrence in Nepal, finding large homologies to other Asian *Orientia* strains. No evidence of SFTS virus infections emerged in this work.

The systemic cytokine profile of IL-6 and IFN- γ showed partially significant differences between the Tsutsugamushi fever patients and blood donors, from which evidence for activation of lymphocytes and the innate immune system can be deduced. TNF- α and IL-10 revealed a weak inflammatory immune response with evidence of possibly only mild disease.

The findings illuminate the clinical characteristics and provide clues for making a suspected clinical diagnosis based on the presence of symptoms such as a subjective feeling of heat, diarrhea, and enlarged inguinal lymph nodes.

The present work adds to the limited body of research on *Orientia tsutsugamushi* in the Nepalese context, providing more detailed data on the seroprevalence of *Orientia*-specific antibodies and inflammatory response in the population, as well as on appropriate molecular diagnostic targets and the heterogeneity of *Orientia tsutsugamushi* in the country. The findings provide new clues for improved understanding of the disease and for establishing appropriate and accurate diagnostics in Nepal. They can also contribute to improved disease management, improved control of Tsutsugamushi fever infections, and the possible development of an appropriate vaccine for Nepal.

7. Literaturverzeichnis

1. Acharya, Bipin Kumar; Chen, Wei; Ruan, Zengliang; Pant, Gobind Prasad; Yang, Yin; Shah, Lalan Prasad et al. (2019): Mapping Environmental Suitability of Scrub Typhus in Nepal Using MaxEnt and Random Forest Models. In: *IJERPH* 16 (23), S. 4845. DOI: 10.3390/ijerph16234845.
2. Adhikari, Shital; Poudel, Ramesh Sharma; Shrestha, Shakti; Bhandari, Nisha (2020): Outcome Predictors in Scrub Typhus Requiring Ventilator and Vasopressor Support. In: *Journal of Nepal Health Research Council* 17 (4), S. 485–490. DOI: 10.33314/jnhrc.v17i4.1991.
3. Amano, K.; Tamura, A.; Ohashi, N.; Urakami, H.; Kaya, S.; Fukushi, K. (1987): Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. In: *Infection and immunity* 55 (9), S. 2290–2292. DOI: 10.1128/iai.55.9.2290-2292.1987.
4. Audy, J. Ralph (1968): Red mites and typhus. London: University of London, Athlone Press (University of London. Heath Clark lectures, 1965).
5. Bajracharya, Luna (2020): Scrub Typhus in Children at Tribhuvan University Teaching Hospital in Nepal. In: *PHMT* 11, S. 193–202. DOI: 10.2147/PHMT.S253106.
6. Basnyat, Buddha (2016): Typhoid versus typhus fever in post-earthquake Nepal. In: *The Lancet Global Health* 4 (8), e516-e517. DOI: 10.1016/S2214-109X(16)30094-8.
7. Batty, Elizabeth M.; Chaemchuen, Suwittra; Blacksell, Stuart; Richards, Allen L.; Paris, Daniel; Bowden, Rory et al. (2018): Long-read whole genome sequencing and comparative analysis of six strains of the human pathogen *Orientia tsutsugamushi*. In: *PLoS neglected tropical diseases* 12 (6), e0006566. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006566.
8. Belanger, K. J.; Kelly, D. J.; Mettelle, F. C.; Hanson, C. V.; Lippert, L. E. (2000): Psoralen photochemical inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in platelet concentrates. In: *Transfusion* 40 (12), S. 1503–1507. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40121503.x.

9. Bengtson, I. A. (1945): Apparent serological heterogeneity among strains of Tsutsugamushi disease (scrub typhus). In: *Public health reports (Washington, D.C.: 1896)* 60, S. 1483–1488. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21004496/>
10. Bhandari, Isha; Karmacharya Malla, Kalpana; Ghimire, Pukar; Bhandari, Bibek (2021): Scrub Typhus among Febrile Children in a Tertiary Care Center of Central Nepal: A Descriptive Cross-sectional Study. In: *J Nepal Med Assoc* 59 (237), S. 437–441. DOI: 10.31729/jnma.6166.
11. Blacksell, Stuart D.; Bryant, Naomi J.; Paris, Daniel H.; Doust, Jenny A.; Sakoda, Yoshihiro; Day, Nicholas P. J. (2007a): Scrub typhus serologic testing with the indirect immunofluorescence method as a diagnostic gold standard: a lack of consensus leads to a lot of confusion. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 44 (3), S. 391–401. DOI: 10.1086/510585.
12. Blacksell, Stuart D.; Jenjaroen, Kemajittra; Phetsouvanh, Rattanaphone; Tanganuchitcharnchai, Ampai; Phouminh, Phonlavanh; Phongmany, Simalee et al. (2010): Accuracy of rapid IgM-based immunochromatographic and immunoblot assays for diagnosis of acute scrub typhus and murine typhus infections in Laos. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 83 (2), S. 365–369. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0534.
13. Blacksell, Stuart D.; Luksameetanasan, Rungnapa; Kalambaheti, Thareerat; Aukkanit, Nuntipa; Paris, Daniel H.; McGready, Rose et al. (2008): Genetic typing of the 56-kDa type-specific antigen gene of contemporary *Orientia tsutsugamushi* isolates causing human scrub typhus at two sites in north-eastern and western Thailand. In: *FEMS immunology and medical microbiology* 52 (3), S. 335–342. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2007.00375.x.
14. Blacksell, Stuart D.; Paris, Daniel H.; Chierakul, Wirongrong; Wuthiekanun, Vanaporn; Teeratakul, Achara; Kantipong, Pacharee; Day, Nicholas P. J. (2012): Prospective evaluation of commercial antibody-based rapid tests in combination with a loop-mediated isothermal amplification PCR assay for detection of *Orientia tsutsugamushi* during

- the acute phase of scrub typhus infection. In: *Clinical and vaccine immunology: CVI* 19 (3), S. 391–395. DOI: 10.1128/CVI.05478-11.
15. Blacksell, Stuart D.; Sharma, Nastu P.; Phumratanaprapin, Weerapong; Jenjaroen, Kemajittra; Peacock, Sharon J.; White, Nicholas J. et al. (2007b): Serological and blood culture investigations of Nepalese fever patients. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101 (7), S. 686–690. DOI: 10.1016/j.trstmh.2007.02.015.
 16. Bonell, Ana; Lubell, Yoel; Newton, Paul N.; Crump, John A.; Paris, Daniel H. (2017): Estimating the burden of scrub typhus: A systematic review. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (9), e0005838. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005838.
 17. Bora, Trishna; Khan, Siraj Ahmed (2019): Evaluation of Th1 and Th2 immune response in clinical and sub-clinical scrub typhus infection. In: *Human immunology* 80 (7), S. 503–509. DOI: 10.1016/j.humimm.2019.03.013.
 18. Brown, G. W.; Shirai, A.; Gan, E.; Bernthall, P. (1981): Antibodies to typhus in Eastern Nepal. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75 (4), S. 586–587. DOI: 10.1016/0035-9203(81)90210-8.
 19. Casleton, B. G.; Salata, K.; Dasch, G. A.; Strickman, D.; Kelly, D. J. (1998): Recovery and viability of *Orientia tsutsugamushi* from packed red cells and the danger of acquiring scrub typhus from blood transfusion. In: *Transfusion* 38 (7), S. 680–689. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1998.38798346638.x.
 20. Chapagain, Ram Hari; Agrawal, Sumit; Pokharel, Sunita; Kayastha, Madhusudhan; Bhattra, Susan; Jha, Anshu et al. (2020): Clinico-Laboratory Profile, Complications and Therapeutic Outcome of Scrub Typhus in Children. In: *Journal of Nepal Health Research Council* 18 (2), S. 282–287. DOI: 10.33314/jnhrc.v18i2.2730.
 21. Chattopadhyay, Suchismita; Richards, Allen L. (2007): Scrub typhus vaccines: past history and recent developments. In: *Human vaccines* 3 (3), S. 73–80. DOI: 10.4161/hv.3.3.4009.

22. Cho, Bon-A; Ko, Youngho; Kim, Yeon-Sook; Kim, Sanguk; Choi, Myung-Sik; Kim, Ik-Sang et al. (2012): Phenotypic characterization of peripheral T cells and their dynamics in scrub typhus patients. In: *PLoS Negl Trop Dis* 6 (8), e1789. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001789.
23. Cho, Nam-Hyuk; Kim, Hang-Rae; Lee, Jung-Hee; Kim, Se-Yoon; Kim, Jaejong; Cha, Sunho et al. (2007): The *Orientia tsutsugamushi* genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (19), S. 7981–7986. DOI: 10.1073/pnas.0611553104.
24. Choi, Ji-Hye; Cheong, Taek-Chin; Ha, Na-Young; Ko, Youngho; Cho, Chung-Hyun; Jeon, Ju-Hong et al. (2013): *Orientia tsutsugamushi* subverts dendritic cell functions by escaping from autophagy and impairing their migration. In: *PLoS Negl Trop Dis* 7 (1), e1981. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001981.
25. Choi, Seong Jin; Park, Sang-Won; Bae, In-Gyu; Kim, Sung-Han; Ryu, Seong Yeol; Kim, Hyun Ah et al. (2016): Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in South Korea, 2013-2015. In: *PLoS Negl Trop Dis* 10 (12), e0005264. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005264.
26. Chu, Hyuk; Lee, Jung-Hee; Han, Seung-Hoon; Kim, Se-Yoon; Cho, Nam-Hyuk; Kim, Ik-Sang; Choi, Myung-Sik (2006): Exploitation of the endocytic pathway by *Orientia tsutsugamushi* in nonprofessional phagocytes. In: *Infection and immunity* 74 (7), S. 4246–4253. DOI: 10.1128/IAI.01620-05.
27. Chu, Hyuk; Park, Sung-Moo; Cheon, In Su; Park, Mi-Yeoun; Shim, Byoung-Shik; Gil, Byoung-Cheol et al. (2013): *Orientia tsutsugamushi* infection induces CD4+ T cell activation via human dendritic cell activity. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 23 (8), S. 1159–1166. DOI: 10.4014/jmb.1303.03019.
28. Chung, Doo Ryeon; Lee, Young Seok; Lee, Seung Soon (2007): Kinetics of inflammatory cytokines in patients with scrub typhus receiving

- doxycycline treatment. In: *The Journal of infection* 56 (1), S. 44–50. DOI: 10.1016/j.jinf.2007.09.009.
29. Chung, Moon-Hyun; Lee, Jin-Soo; Baek, Ji-hyeon; Kim, Mijeong; Kang, Jae-Seung (2012): Persistence of *Orientia tsutsugamushi* in humans. In: *Journal of Korean medical science* 27 (3), S. 231–235. DOI: 10.3346/jkms.2012.27.3.231.
30. Dhimal, Meghnath; Dumre, Shyam Prakash; Sharma, Guna Nidhi; Khanal, Pratik; Ranabhat, Kamal; Shah, Lalan Prasad et al. (2021): An outbreak investigation of scrub typhus in Nepal: confirmation of local transmission. In: *BMC Infect Dis* 21 (1), S. 193. DOI: 10.1186/s12879-021-05866-6.
31. Díaz, Fabián E.; Abarca, Katia; Kalergis, Alexis M. (2018): An Update on Host-Pathogen Interplay and Modulation of Immune Responses during *Orientia tsutsugamushi* Infection. In: *Clinical microbiology reviews* 31 (2). DOI: 10.1128/CMR.00076-17.
32. Elangovan, Divyaa; Perumalla, Susmitha; Rose, Winsley; Verghese, Valsan Philip; Mammen, Joy; Gowri, M. S.; Jude Prakash, John Antony (2019): Assessment of two immunoassays for detection of IgM antibodies to scrub typhus using a serum panel. In: *Indian journal of medical microbiology* 37 (4), S. 584–586. DOI: 10.4103/ijmm.IJMM_20_130.
33. Elliott, Ivo; Pearson, Isabelle; Dahal, Prabin; Thomas, Nigel V.; Roberts, Tamalee; Newton, Paul N. (2019): Scrub typhus ecology: a systematic review of *Orientia* in vectors and hosts. In: *Parasites & vectors* 12 (1), S. 513. DOI: 10.1186/s13071-019-3751-x.
34. Elliott, Ivo; Thangnimitchok, Neeranuch; Cesare, Mariateresa de; Linsuwanon, Piyada; Paris, Daniel H.; Day, Nicholas P. J. et al. (2021): Targeted capture and sequencing of *Orientia tsutsugamushi* genomes from chiggers and humans. In: *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 91, S. 104818. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104818.
35. Emery, Shannon L.; Erdman, Dean D.; Bowen, Michael D.; Newton, Bruce R.; Winchell, Jonas M.; Meyer, Richard F. et al. (2004): Real-time

- reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. In: *Emerging Infectious Diseases* 10 (2), S. 311–316. DOI: 10.3201/eid1002.030759.
36. Enatsu, T.; Urakami, H.; Tamura, A. (1999): Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. In: *FEMS microbiology letters* 180 (2), S. 163–169. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb08791.x.
37. Epidemiology and Disease Control Division (2015): EDCD interim Guideline on Prevention and Control of Scrub Typhus. Hg. v. Department of Health Services, Ministry of Health and Population. Government of Nepal. Online verfügbar unter <http://www.edcd.gov.np/resource-detail/scrub-typhus-guideline-on-prevention-and-control>, zuletzt geprüft am 18.11.2021.
38. Fan, M. Y.; Walker, D. H.; Yu, S. R.; Liu, Q. H. (1987): Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the People's Republic of China. In: *Reviews of infectious diseases* 9 (4), S. 823–840.
39. Fang, Yirong; Huang, Zhaohui; Tu, Chunyu; Zhang, Lijie; Ye, Dongqing; Zhu, Bao-Ping (2012): Meta-analysis of drug treatment for scrub typhus in Asia. In: *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 51 (17), S. 2313–2320. DOI: 10.2169/internalmedicine.51.7816.
40. Gautam, Rajendra; Parajuli, Keshab; Sherchand, Jeevan Bahadur (2019): Epidemiology, Risk Factors and Seasonal Variation of Scrub Typhus Fever in Central Nepal. In: *Tropical medicine and infectious disease* 4 (1), S. 27. DOI: 10.3390/tropicalmed4010027.
41. Gautam, Rajendra; Parajuli, Keshab; Tadeipalli, Mythili; Graves, Stephen; Stenos, John; Sherchand, Jeevan Bahadur (2021): Scrub Typhus and Molecular Characterization of *Orientia tsutsugamushi* from Central Nepal. In: *Pathogens* 10 (4), S. 422. DOI: 10.3390/pathogens10040422.
42. Gautam, Rajendra; Parajuli, Keshab; Tshokey, Tshokey; Stenos, John; Sherchand, Jeevan Bahadur (2020): Diagnostic evaluation of IgM ELISA and IgM Immunofluorescence assay for the diagnosis of Acute Scrub

- Typhus in central Nepal. In: *BMC Infect Dis* 20 (1), S. 138. DOI: 10.1186/s12879-020-4861-y.
43. Ghimire, Ram Hari; Ghimire, Ashima; Dhungana, Sunil; Bista, Bides; Shreewastav, Rupesh Kumar (2020): Clinical Profile and Outcome of Adult Patients with Scrub Typhus in a Tertiary Care Centre of Eastern Nepal: A Descriptive Cross-sectional Study. In: *J Nepal Med Assoc* 58 (223), S. 165–169. DOI: 10.31729/jnma.4777.
 44. Groves, M. G.; Kelly, D. J. (1989): Characterization of factors determining *Rickettsia tsutsugamushi* pathogenicity for mice. In: *Infection and immunity* 57 (5), S. 1476–1482. DOI: 10.1128/iai.57.5.1476-1482.1989.
 45. Gupta, Birendra Prasad; Lama, Thupten K.; Adhikari, Anurag; Shrestha, Ananta; Rauniyar, Ramanuj; Sapkota, Binay et al. (2016): First report of hepatitis E virus viremia in healthy blood donors from Nepal. In: *Virusdisease* 27 (3), S. 324–326. DOI: 10.1007/s13337-016-0331-y.
 46. Ha, Na-Young; Kim, Yuri; Min, Chan-Ki; Kim, Hong-Il; Yen, Nguyen Thi Hai; Choi, Myung-Sik et al. (2017): Longevity of antibody and T-cell responses against outer membrane antigens of *Orientia tsutsugamushi* in scrub typhus patients. In: *Emerging microbes & infections* 6 (12), e116. DOI: 10.1038/emi.2017.106.
 47. Hauptmann, Matthias; Kolbaum, Julia; Lilla, Stefanie; Wozniak, David; Gharaibeh, Mohammad; Fleischer, Bernhard; Keller, Christian A. (2016): Protective and Pathogenic Roles of CD8+ T Lymphocytes in Murine *Orientia tsutsugamushi* Infection. In: *PLoS Negl Trop Dis* 10 (9), e0004991. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004991.
 48. Hengbin, Guo; Min, Cao; Kaihua, Tao; Jiaqi, Tang (2006): The foci of scrub typhus and strategies of prevention in the Spring in Pingtan Island, Fujian Province. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1078, S. 188–196. DOI: 10.1196/annals.1374.130.
 49. Heo, Dae Hyuk; Kang, Yu Min; Song, Kyoung Ho; Seo, Jun Won; Kim, Jeong Han; Chun, June Young et al. (2020): Clinical Score System to Differentiate Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Patients from Patients with Scrub Typhus or Hemorrhagic Fever with Renal

- Syndrome in Korea. In: *J Korean Med Sci* 35 (11), e77. DOI: 10.3346/jkms.2020.35.e77.
50. Im, Jae-Hyoung; Baek, Ji Hyeon; Lee, Jin-Soo; Chung, Moon-Hyun; Lee, Sun Myoung; Kang, Jae-Seung (2014): In vitro bacteriostatic effects of rifampin on *Orientia tsutsugamushi*. In: *Journal of Korean medical science* 29 (2), S. 183–189. DOI: 10.3346/jkms.2014.29.2.183.
51. Iwasaki, H.; Takada, N.; Nakamura, T.; Ueda, T. (1997): Increased levels of macrophage colony-stimulating factor, gamma interferon, and tumor necrosis factor alpha in sera of patients with *Orientia tsutsugamushi* infection. In: *J Clin Microbiol* 35 (12), S. 3320–3322. DOI: 10.1128/jcm.35.12.3320-3322.1997.
52. Iwasaki, Hiromichi; Mizoguchi, Jiro; Takada, Nobuhiro; Tai, Katsunori; Ikegaya, Satoshi; Ueda, Takanori (2010): Correlation between the concentrations of tumor necrosis factor-alpha and the severity of disease in patients infected with *Orientia tsutsugamushi*. In: *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 14 (4), e328-33. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.06.002.
53. Izzard, Leonard; Fuller, Andrew; Blacksell, Stuart D.; Paris, Daniel H.; Richards, Allen L.; Aukkanit, Nuntipa et al. (2010): Isolation of a novel *Orientia* species (*O. chuto* sp. nov.) from a patient infected in Dubai. In: *Journal of clinical microbiology* 48 (12), S. 4404–4409. DOI: 10.1128/JCM.01526-10.
54. Jerrells, T. R.; Osterman, J. V. (1981): Host defenses in experimental scrub typhus: inflammatory response of congenic C3H mice differing at the Ric gene. In: *Infection and immunity* 31 (3), S. 1014–1022. DOI: 10.1128/iai.31.3.1014-1022.1981.
55. Jerrells, T. R.; Osterman, J. V. (1983): Development of specific and cross-reactive lymphocyte proliferative responses during chronic immunizing infections with *Rickettsia tsutsugamushi*. In: *Infection and immunity* 40 (1), S. 147–156. DOI: 10.1128/iai.40.1.147-156.1983.

56. Jiang, Ju; Chan, Teik-Chye; Temenak, Joseph J.; Dasch, Gregory A.; Ching, Wei-Mei; Richards, Allen L. (2004): Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70 (4), S. 351–356. DOI: 10.4269/ajtmh.2004.70.351.
57. Jiang, Ju; Paris, Daniel H.; Blacksell, Stuart D.; Aukkanit, Nuntipa; Newton, Paul N.; Phetsouvanh, Rattanaphone et al. (2013): Diversity of the 47-kD HtrA nucleic acid and translated amino acid sequences from 17 recent human isolates of *Orientia*. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 13 (6), S. 367–375. DOI: 10.1089/vbz.2012.1112.
58. John, Rebecca; Varghese, George M. (2020): Scrub typhus: a reemerging infection. In: *Current opinion in infectious diseases* 33 (5), S. 365–371. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000664.
59. Kang, Seung-Ji; Park, Kyung-Hwa; Jung, Sook-In; Jang, Hee Chang; Ji, Soo Young; Ahn, Jae Sook et al. (2010): Scrub typhus induced by peripheral blood stem cell transplantation in the immunocompromised patient: diagnostic usefulness of nested polymerase chain reaction. In: *Transfusion* 50 (2), S. 467–470. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02442.x.
60. Kannan, Kavitha; John, Rebecca; Kundu, Debasree; Dayanand, Divya; Abhilash, Kundavaram P. P.; Mathuram, Alice Joan et al. (2020): Performance of molecular and serologic tests for the diagnosis of scrub typhus. In: *PLoS Negl Trop Dis* 14 (11), e0008747. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008747.
61. Karki, Khem Bahadur; Acharya, Bhim Prasad; Meghnath Dhimal; Krishna Kumar Aryal; Guna Nidhi Sharma; Pratik Khanal et al. (2017): Descriptive Epidemiology of Scrub Typhus in Nepal, 2017.
62. Keller, Christian A.; Hauptmann, Matthias; Kolbaum, Julia; Gharaibeh, Mohammad; Neumann, Melanie; Glatzel, Markus; Fleischer, Bernhard (2014): Dissemination of *Orientia tsutsugamushi* and inflammatory responses in a murine model of scrub typhus. In: *PLoS neglected tropical diseases* 8 (8), e3064. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003064.

63. Kelly, Daryl J.; Fuerst, Paul A.; Ching, Wei-Mei; Richards, Allen L. (2009): Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi*. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 Suppl 3, S203-30. DOI: 10.1086/596576.
64. Khaisuwan, S.; Kantipong, P.; Watt, G.; Burnouf, T. (2001): Transmission of scrub typhus by blood transfusion? In: *Transfusion* 41 (11), S. 1454–1455. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2001.41111454.x.
65. Kim, Choon-Mee; Cho, Min Keun; Kim, Dong-Min; Yun, Na-Ra; Kim, Seok Won; Jang, Sook Jin et al. (2016a): Accuracy of Conventional PCR Targeting the 16S rRNA Gene with the Ot-16sRF1 and Ot-16sRR1 Primers for Diagnosis of Scrub Typhus: a Case-Control Study. In: *Journal of clinical microbiology* 54 (1), S. 178–179. DOI: 10.1128/JCM.01754-15.
66. Kim, D. M.; Lee, Y-M; Back, J-H; Yang, T. Y.; Lee, J. H.; Song, H-J et al. (2010): A serosurvey of *Orientia tsutsugamushi* from patients with scrub typhus. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 16 (5), S. 447–451. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02865.x.
67. Kim, Dong-Min; Byun, Joo Nam (2008): Effects of antibiotic treatment on the results of nested PCRs for scrub typhus. In: *Journal of clinical microbiology* 46 (10), S. 3465–3466. DOI: 10.1128/JCM.00634-08.
68. Kim, Dong-Min; Kim, Hyun Lee; Park, Chi Young; Yang, Tae Young; Lee, Ji Hyun; Yang, Jong Tae et al. (2006a): Clinical usefulness of eschar polymerase chain reaction for the diagnosis of scrub typhus: a prospective study. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 43 (10), S. 1296–1300. DOI: 10.1086/508464.
69. Kim, Dong-Min; Park, Geon; Kim, Hyong Sun; Lee, Joo Young; Neupane, Ganesh Prasad; Graves, Stephen; Stenos, John (2011): Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of scrub typhus. In: *J Clin Microbiol* 49 (2), S. 607–612. DOI: 10.1128/JCM.01216-09.

70. Kim, Dong-Min; Won, Kyung Jun; Park, Chi Young; Yu, Ki Dong; Kim, Hyong Sun; Yang, Tae Young et al. (2007): Distribution of eschars on the body of scrub typhus patients: a prospective study. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 76 (5), S. 806–809.
71. Kim, Gwanghun; Ha, Na-Young; Min, Chan-Ki; Kim, Hong-II; Yen, Nguyen Thi Hai; Lee, Keun-Hwa et al. (2017): Diversification of *Orientia tsutsugamushi* genotypes by intragenic recombination and their potential expansion in endemic areas. In: *PLoS neglected tropical diseases* 11 (3), e0005408. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005408.
72. Kim, Hyun Lee; Park, Hye Rim; Kim, Choon-Mee; Cha, Youn Jung; Yun, Na Ra; Kim, Dong-Min (2019a): Indicators of severe prognosis of scrub typhus: prognostic factors of scrub typhus severity. In: *BMC Infect Dis* 19 (1), S. 283. DOI: 10.1186/s12879-019-3903-9.
73. Kim, Jeong Han; Lee, Chang Seop; Moon, Chisook; Kwak, Yee Gyung; Kim, Baek Nam; Kim, Eu Suk et al. (2019b): Co-Infection of Scrub Typhus and Human Granulocytic Anaplasmosis in Korea, 2006. In: *J Korean Med Sci* 34 (39), e257. DOI: 10.3346/jkms.2019.34.e257.
74. Kim, Jinhyun; Lee, Eunhee; Rhee, Hae-Chun (2012): Cost-benefit analysis of the tsutsugamushi disease prevention program in South Korea. In: *Japanese journal of infectious diseases* 65 (3), S. 222–227. DOI: 10.7883/yoken.65.222.
75. Kim, Mi-Jeong; Kim, Mee-Kyung; Kang, Jae-Seung (2006b): *Orientia tsutsugamushi* inhibits tumor necrosis factor alpha production by inducing interleukin 10 secretion in murine macrophages. In: *Microbial pathogenesis* 40 (1), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.micpath.2005.09.002.
76. Kim, Min-Chul; Chong, Yong Pil; Lee, Sang-Oh; Choi, Sang-Ho; Kim, Yang Soo; Woo, Jun Hee; Kim, Sung-Han (2018): Differentiation of Severe Fever With Thrombocytopenia Syndrome From Scrub Typhus. In: *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 66 (10), S. 1621–1624. DOI: 10.1093/cid/cix1119.

77. Kim, S. W.; Ihn, K. S.; Han, S. H.; Seong, S. Y.; Kim, I. S.; Choi, M. S. (2001): Microtubule- and dynein-mediated movement of *Orientia tsutsugamushi* to the microtubule organizing center. In: *Infection and immunity* 69 (1), S. 494–500. DOI: 10.1128/IAI.69.1.494-500.2001.
78. Kim, Seok Won; Kim, Choon-Mee; Kim, Dong-Min; Yun, Na Ra; Neupane, Ganesh P.; Pyun, Sang-Hyun; Yu, Byeong Jeon (2021): *Orientia tsutsugamushi* DNA load and genotypes in blood as a marker of severity. In: *Acta Tropica* 215, S. 105786. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105786.
79. Kim, Yeon-Sook; Lee HJ; Chang M; Son SK; Rhee Y; Shim SK (2006c): Scrub Typhus during Pregnancy and its Treatment: A Case Series and Review of the Literature. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75 (5), S. 955–959. DOI: 10.4269/ajtmh.2006.75.955.
80. Kim, Young-Jin; Park, Sungman; Premaratna, Ranjan; Selvaraj, Stephen; Park, Sang-Jin; Kim, Sora et al. (2016b): Clinical Evaluation of Rapid Diagnostic Test Kit for Scrub Typhus with Improved Performance. In: *J Korean Med Sci* 31 (8), S. 1190–1196. DOI: 10.3346/jkms.2016.31.8.1190.
81. Kingston, Hugh W. F.; Blacksell, Stuart D.; Tanganuchitcharnchai, Ampai; Laongnualpanich, Achara; Basnyat, Buddha; Day, Nicholas P. J.; Paris, Daniel H. (2015): Comparative Accuracy of the InBios Scrub Typhus Detect IgM Rapid Test for the Detection of IgM Antibodies by Using Conventional Serology. In: *Clinical and vaccine immunology : CVI* 22 (10), S. 1130–1132. DOI: 10.1128/CVI.00390-15.
82. Kock, Fredericke; Hauptmann, Matthias; Osterloh, Anke; Schäberle, Till F.; Poppert, Sven; Frickmann, Hagen et al. (2018): *Orientia tsutsugamushi* Is Highly Susceptible to the RNA Polymerase Switch Region Inhibitor Corallopyronin A In Vitro and In Vivo. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 62 (4). DOI: 10.1128/AAC.01732-17.
83. Kramme, Stefanie; van An; Khoa, Nguyen Dinh; van Trin; Tannich, Egbert; Rybniker, Jan et al. (2009): *Orientia tsutsugamushi* bacteremia

- and cytokine levels in Vietnamese scrub typhus patients. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (3), S. 586–589. DOI: 10.1128/JCM.00997-08.
84. Kundavaram, A. P.; Jonathan, A. J.; Nathaniel, S. D.; Varghese, G. M. (2013): Eschar in scrub typhus: a valuable clue to the diagnosis. In: *Journal of postgraduate medicine* 59 (3), S. 177–178. DOI: 10.4103/0022-3859.118033.
85. Kwon, Jeong Ran; Won, Eun Jeong; Jo, Hyun Jung; Choi, Sae Rom; Lee, Kyoungyul; Kim, Sinyoung et al. (2016): Serious Adverse Transfusion Reactions Reported in the National Recipient-Triggered Trace Back System in Korea (2006-2014). In: *Ann Lab Med* 36 (4), S. 335–341. DOI: 10.3343/alm.2016.36.4.335.
86. Lee, Seung-Hyun; Kim, Dong-Min; Cho, Young Shin; Yoon, Sung Ho; Shim, Soo Kyoung (2006): Usefulness of eschar PCR for diagnosis of scrub typhus. In: *Journal of clinical microbiology* 44 (3), S. 1169–1171. DOI: 10.1128/JCM.44.3.1169-1171.2006.
87. Levine, Harold D. (1946): Pathologic study of thirty-one cases of scrub typhus fever with especial reference to the cardiovascular system. In: *American Heart Journal* 31 (3), S. 314–328. DOI: 10.1016/0002-8703(46)90313-4.
88. Lim, Cherry; Blacksell, Stuart D.; Laongnualpanich, Achara; Kantipong, Pacharee; Day, Nicholas P. J.; Paris, Daniel H.; Limmathurotsakul, Direk (2015): Optimal Cutoff Titers for Indirect Immunofluorescence Assay for Diagnosis of Scrub Typhus. In: *Journal of clinical microbiology* 53 (11), S. 3663–3666. DOI: 10.1128/JCM.01680-15.
89. Liu, Qin; Panpanich, Ratana (2018): Antibiotics for treating scrub typhus. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews* (3), CD002150. DOI: 10.1002/14651858.CD002150.
90. Liu, Quan; He, Biao; Huang, Si-Yang; Wei, Feng; Zhu, Xing-Quan (2014): Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis. In: *The Lancet Infectious Diseases* 14 (8), S. 763–772. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)70718-2.

91. Lu, Hsiu-Ying; Tsai, Kun-Hsien; Yu, Sheng-Kai; Cheng, Chia-Hsin; Yang, Jr-Shiang; Su, Chien-Ling et al. (2010): Phylogenetic analysis of 56-kDa type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolates in Taiwan. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 83 (3), S. 658–663. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0608.
92. MacMillan, J. G.; Rice, R. M.; Jerrells, T. R. (1985): Development of antigen-specific cell-mediated immune responses after infection of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with *Rickettsia tsutsugamushi*. In: *The Journal of infectious diseases* 152 (4), S. 739–749. DOI: 10.1093/infdis/152.4.739.
93. Mahajan, Sanjay K.; Rolain, Jean-Marc; Kashyap, Rajesh; Bakshi, Diprabhanu; Sharma, Vijay; Prasher, Bhupal Singh et al. (2006): Scrub typhus in Himalayas. In: *Emerging Infectious Diseases* 12 (10), S. 1590–1592. DOI: 10.3201/eid1210.051697.
94. Maina, Alice N.; Farris, Christina M.; Odhiambo, Antony; Jiang, Ju; Laktabai, Jeremiah; Armstrong, Janice et al. (2016): Q Fever, Scrub Typhus, and Rickettsial Diseases in Children, Kenya, 2011-2012. In: *Emerging Infectious Diseases* 22 (5), S. 883–886. DOI: 10.3201/eid2205.150953.
95. Martín-Fontecha, Alfonso; Lanzavecchia, Antonio; Sallusto, Federica (2009): Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. In: *Handbook of experimental pharmacology* (188), S. 31–49. DOI: 10.1007/978-3-540-71029-5_2.
96. Mettelle, F. C.; Salata, K. F.; Belanger, K. J.; Casleton, B. G.; Kelly, D. J. (2000): Reducing the risk of transfusion-transmitted rickettsial disease by WBC filtration, using *Orientia tsutsugamushi* in a model system. In: *Transfusion* 40 (3), S. 290–296. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40030290.x.
97. Moron, C. G.; Popov, V. L.; Feng, H. M.; Wear, D.; Walker, D. H. (2001): Identification of the target cells of *Orientia tsutsugamushi* in human cases of scrub typhus. In: *Modern pathology: an official journal of the United*

- States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 14 (8), S. 752–759. DOI: 10.1038/modpathol.3880385.
98. Murdoch, David R.; Christopher W Woods; Mark D Zimmerman; Peter M Dull; Ram Hari Belbase; Andrew J Keenan et al. (2004): The etiology of febrile illness in adults presenting to Patan hospital in Kathmandu, Nepal. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 70 (6), S. 670–675. DOI: 10.4269/ajtmh.2004.70.670.
99. Nagayo, M.; Miyagawa, Y.; Mitamura, T.; Imamura, A. (1917): On the Nymph and Prosopon of the Tsutsugamushi, *Leptotrombidium akamushi*, n.sp. (*Trombidium akamushi* brumpt), Carrier of the Tsutsugamushi Disease. In: *The Journal of experimental medicine* 25 (2), S. 255–272. DOI: 10.1084/jem.25.2.255.
100. Nakayama, Keisuke; Kurokawa, Ken; Fukuhara, Masahiro; Urakami, Hiroshi; Yamamoto, Seigo; Yamazaki, Kazuko et al. (2010): Genome comparison and phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains. In: *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 17 (5), S. 281–291. DOI: 10.1093/dnares/dsq018.
101. Nakayama, Keisuke; Yamashita, Atsushi; Kurokawa, Ken; Morimoto, Takuya; Ogawa, Michihiro; Fukuhara, Masahiro et al. (2008): The Whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. In: *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 15 (4), S. 185–199. DOI: 10.1093/dnares/dsn011.
102. Nayak, Niranjana (2016): Scrub Typhus in Nepal. In: *Nepal journal of epidemiology* 6 (2), S. 563–564. DOI: 10.3126/nje.v6i2.15162.
103. Ogawa, Masao; Ono, Testuro (2008): Epidemiological characteristics of tsutsugamushi disease in Oita Prefecture, Japan: yearly and monthly occurrences of its infections and serotypes of its causative agent, *Orientia tsutsugamushi*, during 1984--2005. In: *Microbiology and*

- immunology* 52 (3), S. 135–143. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00024.x.
104. Ohashi, N.; Fukuhara, M.; Shimada, M.; Tamura, A. (1995): Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. In: *FEMS microbiology letters* 125 (2-3), S. 299–304. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07372.x.
105. Ohashi, N.; Koyama, Y.; Urakami, H.; Fukuhara, M.; Tamura, A.; Kawamori, F. et al. (1996): Demonstration of antigenic and genotypic variation in *Orientia tsutsugamushi* which were isolated in Japan, and their classification into type and subtype. In: *Microbiology and immunology* 40 (9), S. 627–638. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1996.tb01120.x.
106. Ohashi, N.; Nashimoto, H.; Ikeda, H.; Tamura, A. (1992a): Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. Sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic variants. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (18), S. 12728–12735. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1618776/>.
107. Ohashi, N.; Nashimoto, H.; Ikeda, H.; Tamura, A. (1992b): Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. Sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic variants. In: *Journal of Biological Chemistry* 267 (18), S. 12728–12735. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42337-X.
108. Olson, J. G.; Bourgeois, A. L.; Fang, R. C.; Coolbaugh, J. C.; Dennis, D. T. (1980): Prevention of scrub typhus. Prophylactic administration of doxycycline in a randomized double blind trial. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29 (5), S. 989–997.
109. Otterdal, Kari; Janardhanan, Jeshina; Astrup, Elisabeth; Ueland, Thor; Prakash, John A. J.; Lekva, Tove et al. (2014): Increased endothelial and macrophage markers are associated with disease severity and mortality

- in scrub typhus. In: *The Journal of infection* 69 (5), S. 462–469. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.06.018.
110. Paris, D. H.; Chansamouth, V.; Nawtaisong, P.; Löwenberg, E. C.; Phetsouvanh, R.; Blacksell, S. D. et al. (2012a): Coagulation and inflammation in scrub typhus and murine typhus—a prospective comparative study from Laos. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (12), S. 1221–1228. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03717.x.
111. Paris, Daniel H.; Phetsouvanh, Rattanaphone; Tanganuchitcharnchai, Ampai; Jones, Margaret; Jenjaroen, Kemajittra; Vongsouvath, Manivanh et al. (2012b): *Orientia tsutsugamushi* in human scrub typhus eschars shows tropism for dendritic cells and monocytes rather than endothelium. In: *PLoS Negl Trop Dis* 6 (1), e1466. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001466.
112. Paris, Daniel H.; Shelite, Thomas R.; Day, Nicholas P.; Walker, David H. (2013): Unresolved problems related to scrub typhus: a seriously neglected life-threatening disease. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 89 (2), S. 301–307. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0064.
113. Paris, Daniel H.; Stephan, Femke; Bulder, Ingrid; Wouters, Diana; van der Poll, Tom; Newton, Paul N. et al. (2015): Increased Nucleosomes and Neutrophil Activation Link to Disease Progression in Patients with Scrub Typhus but Not Murine Typhus in Laos. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9 (8), e0003990. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003990.
114. Park, Sang-Won; Lee, Chang-Seop; Kim, Jeong-Han; Bae, In-Gyu; Moon, Chisook; Kwak, Yee Gyung et al. (2019): Severe fever with thrombocytopenia syndrome: comparison with scrub typhus and clinical diagnostic prediction. In: *BMC Infect Dis* 19 (1), S. 174. DOI: 10.1186/s12879-019-3773-1.
115. Parola, Philippe; Blacksell, Stuart D.; Phetsouvanh, Rattanaphone; Phongmany, Simaly; Rolain, Jean-Marc; Day, Nicholas P. J. et al. (2008): Genotyping of *Orientia tsutsugamushi* from humans with scrub typhus,

- Laos. In: *Emerging Infectious Diseases* 14 (9), S. 1483–1485. DOI: 10.3201/eid1409.071259.
116. Pathak, Santosh; Chaudhary, Nagendra; Dhakal, Prativa; Shakya, Disuja; Dhungel, Prativa; Neupane, Gagan et al. (2019): Clinical profile, complications and outcome of scrub typhus in children: A hospital based observational study in central Nepal. In: *PloS one* 14 (8), e0220905. DOI: 10.1371/journal.pone.0220905.
117. Phetsouvanh, Rattanaphone; Sonthayanon, Piengchan; Pukrittayakamee, Sasithon; Paris, Daniel H.; Newton, Paul N.; Feil, Edward J.; Day, Nicholas P. J. (2015): The Diversity and Geographical Structure of *Orientia tsutsugamushi* Strains from Scrub Typhus Patients in Laos. In: *PLoS neglected tropical diseases* 9 (8), e0004024. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004024.
118. Philip, Cornelius B. (1948): Tsutsugamushi Disease (Scrub Typhus) in World War II. In: *The Journal of Parasitology* 34 (3), S. 169. DOI: 10.2307/3273264.
119. Pokhrel, Anil; Rayamajhee, Binod; Khadka, Saroj; Thapa, Sandeep; Kapali, Samjhana; Pun, Sher Bahadur et al. (2021): Seroprevalence and Clinical Features of Scrub Typhus among Febrile Patients Attending a Referral Hospital in Kathmandu, Nepal. In: *Tropical medicine and infectious disease* 6 (2). DOI: 10.3390/tropicalmed6020078.
120. Poomalar, G. K.; Rekha, R. (2014): A case series of scrub typhus in obstetrics. In: *JCDR* 8 (12), OR01-3. DOI: 10.7860/JCDR/2014/9718.5258.
121. Premaratna, Ranjan; Blanton, Lucas S.; Samaraweera, Dilhar N.; Silva, G. Nalika N. de; Chandrasena, Nilmini T. G. A.; Walker, David H.; Silva, H. J. de (2017): Genotypic characterization of *Orientia tsutsugamushi* from patients in two geographical locations in Sri Lanka. In: *BMC infectious diseases* 17 (1), S. 67. DOI: 10.1186/s12879-016-2165-z.
122. Ra, Sang Hyun; Kim, Ji Yeun; Cha, Hye Hee; Kwon, Ji-Soo; Lee, Hyun-Jung; Jeon, Na Young et al. (2019): Coinfection of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome and Scrub Typhus in Patients with Tick-

- Borne Illness. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 101 (6), S. 1259–1262. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0242.
123. Rai, Shiba Kumar (2018): Changing Trend of Infectious Diseases in Nepal. In: Rameshwar Adhikari und Santosh Thapa (Hg.): *Infectious Diseases and Nanomedicine III. Second International Conference (ICIDN - 2015)*, Dec. 15-18, 2015, Kathmandu, Nepal, Bd. 1052. Singapore: Springer Singapore (Advances in Experimental Medicine and Biology, 1052), S. 19–38.
124. Rajapakse, Senaka; Rodrigo, Chaturaka; Fernando, Sumadhya Deepika (2011): Drug treatment of scrub typhus. In: *Tropical doctor* 41 (1), S. 1–4. DOI: 10.1258/td.2010.100311.
125. Rentas, Francisco; Harman, Ronald; Gomez, Charlotte; Salata, Jeanne; Childs, Joseph; Silva, Tonya et al. (2007): Inactivation of *Orientia tsutsugamushi* in red blood cells, plasma, and platelets with riboflavin and light, as demonstrated in an animal model. In: *Transfusion* 47 (2), S. 240–247. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01094.x.
126. Robinson, D. M.; Gan, E.; Chan, T. C.; Huxsoll, D. L. (1977): Patterns of rickettsemia and antibody response in silvered leaf monkeys (*Presbytis cristatus*) after inoculation with virulent and avirulent strains of *Rickettsia tsutsugamushi*. In: *The Journal of infectious diseases* 135 (4), S. 664–668. DOI: 10.1093/infdis/135.4.664.
127. Robinson, D. M.; Gan, E.; Chan, T. C.; Huxsoll, D. L. (1981): Clinical and immunologic responses of silvered leaf monkeys (*Presbytis cristatus*) to experimental reinfection with *Rickettsia tsutsugamushi*. In: *The Journal of infectious diseases* 143 (4), S. 558–561. DOI: 10.1093/infdis/143.4.558.
128. Ruang-Areerate, Toon; Jeamwattanaalert, Pimmada; Rodkvamtook, Wuttikorn; Richards, Allen L.; Sunyakumthorn, Piyanate; Gaywee, Jariyanart (2011): Genotype diversity and distribution of *Orientia tsutsugamushi* causing scrub typhus in Thailand. In: *Journal of clinical microbiology* 49 (7), S. 2584–2589. DOI: 10.1128/JCM.00355-11.
129. Santibáñez, Paula; Palomar, Ana M.; Portillo, Aránzazu; Santibáñez, Sonia; Oteo, José A. (2015): The Role of Chiggers as Human

- Pathogens. In: Amidou Samie (Hg.): An Overview of Tropical Diseases: InTech.
130. Saraswati, Kartika; Maguire, Brittany J.; McLean, Alistair R. D.; Singh-Phulgenda, Sauman; Ngu, Roland C.; Newton, Paul N. et al. (2021): Systematic review of the scrub typhus treatment landscape: Assessing the feasibility of an individual participant-level data (IPD) platform. In: *PLoS Negl Trop Dis* 15 (10), e0009858. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009858.
 131. Satoh, Masaaki; Akashi, Shintaro; Ogawa, Motohiko; Wakeyama, Takatoshi; Ogawa, Hiroshi; Fukuma, Aiko et al. (2017): Retrospective survey of severe fever with thrombocytopenia syndrome in patients with suspected rickettsiosis in Japan. In: *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 23 (1), S. 45–50. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.09.011.
 132. Saunders, J.P; Brown, G.W; Shirai, A.; Huxsoll, D.L (1980): The longevity of antibody to *Rickettsia tsutsugamushi* in patients with confirmed scrub typhus. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74 (2), S. 253–257. DOI: 10.1016/0035-9203(80)90254-0.
 133. Sengupta, Mallika; Anandan, Shalini; Daniel, Dolly; Prakash, John Antony Jude (2015): Scrub Typhus Seroprevalence in Healthy Indian Population. In: *JCDR* 9 (10), DM01-2. DOI: 10.7860/JCDR/2015/14708.6623.
 134. Sharma, Puran K.; Ramakrishnan, R.; Hutin, Y. J. F.; Barui, A. K.; Manickam, P.; Kakkar, M. et al. (2009): Scrub typhus in Darjeeling, India: opportunities for simple, practical prevention measures. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103 (11), S. 1153–1158. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.02.006.
 135. Sheehy, T. W.; Hazlett, D.; Turk, R. E. (1973): Scrub typhus. A comparison of chloramphenicol and tetracycline in its treatment. In: *Archives of internal medicine* 132 (1), S. 77–80. DOI: 10.1001/archinte.132.1.77.

136. Shishido, A. (1964): Strain Variation of Rickettsia Orientalis in the Complement Fixation Test. In: *Japanese journal of medical science & biology* 17, S. 59–72. DOI: 10.7883/yoken1952.17.59.
137. Smadel, J. E.; Ley, H. L.; Diercks, F. H.; Paterson, P. Y.; Wisseman, C. L.; Traub, R. (1952a): Immunization against scrub typhus: duration of immunity in volunteers following combined living vaccine and chemoprophylaxis. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 1 (1), S. 87–99. DOI: 10.4269/ajtmh.1952.1.87.
138. Smadel, J. E.; Ley, H. L.; Diercks, F. H.; Traub, R. (1950): Immunity in scrub typhus: resistance to induced reinfection. In: *A.M.A. archives of pathology* 50 (6), S. 847–861.
139. Smadel, J. E.; Ley, H. L.; Diercks, R. H.; Cameron J. A. P. (1952b): Persistence of Rickettsia tsutsugamushi in tissues of patients recovered from scrub typhus. In: *American journal of hygiene* 56 (3), S. 294–302. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119553.
140. Smadel, J. E.; Woodward, T. E.; Ley, H. L.; Philip, C. B.; Traub, R.; Lewthwaite, B.; Savor, S. R. (1948): Chloromycetin in the Treatment of Scrub Typhus. In: *Science (New York, N.Y.)* 108 (2798), S. 160–161. DOI: 10.1126/science.108.2798.160.
141. Sonthayanon, P.; Chierakul, Wirongrong; Wuthiekanun, Vanaporn; Blacksell, Stuart D.; Pimda, Kriangsak; Suputtamongkol, Yupin et al. (2006): Rapid diagnosis of scrub typhus in rural Thailand using polymerase chain reaction. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75 (6), S. 1099–1102. DOI: 10.4269/ajtmh.2006.75.1099.
142. Sonthayanon, P.; Chierakul, Wirongrong; Wuthiekanun, Vanaporn; Pimda, Kriangsak; Pukrittayakamee, Sasithon; Day, Nicholas P.; Peacock, Sharon J. (2009): Association of high Orientia tsutsugamushi DNA loads with disease of greater severity in adults with scrub typhus. In: *Journal of clinical microbiology* 47 (2), S. 430–434. DOI: 10.1128/JCM.01927-08.
143. Sonthayanon, P.; Peacock, Sharon J.; Chierakul, Wirongrong; Wuthiekanun, Vanaporn; Blacksell, Stuart D.; Holden, Mathew T. G. et al.

- (2010): High rates of homologous recombination in the mite endosymbiont and opportunistic human pathogen *Orientia tsutsugamushi*. In: *PLoS neglected tropical diseases* 4 (7), e752. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000752.
144. Soong, Lynn; Mendell, Nicole L.; Olano, Juan P.; Rockx-Brouwer, Dedeke; Xu, Guang; Goez-Rivillas, Yenny et al. (2016): An Intradermal Inoculation Mouse Model for Immunological Investigations of Acute Scrub Typhus and Persistent Infection. In: *PLoS Negl Trop Dis* 10 (8), e0004884. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004884.
145. Sriwongpan, Pamornsri; Krittigamas, Pornsuda; Kantipong, Pacharee; Kunyanone, Naowarat; Patumanond, Jayanton; Namwongprom, Sirianong (2013): Clinical indicators for severe prognosis of scrub typhus. In: *Risk management and healthcare policy* 6, S. 43–49. DOI: 10.2147/RMHP.S52470.
146. Sun, Jimin; Lu, Liang; Wu, Haixia; Yang, Jun; Ren, Jiangping; Liu, Qiyong (2017): The changing epidemiological characteristics of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011-2016. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 9236. DOI: 10.1038/s41598-017-08042-6.
147. Tamura, A.; Ohashi, N.; Urakami, H.; Miyamura, S. (1995): Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. In: *International journal of systematic bacteriology* 45 (3), S. 589–591. DOI: 10.1099/00207713-45-3-589.
148. Tamura, A.; Ohashi, N.; Urakami, H.; Takahashi, K.; Oyanagi, M. (1985): Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. In: *Infection and immunity* 48 (3), S. 671–675. DOI: 10.1128/iai.48.3.671-675.1985.
149. Tantibhedhyangkul, Wiwit; Angelakis, Emmanouil; Tongyoo, Narongchai; Newton, Paul N.; Moore, Catrin E.; Phetsouvanh, Rattanaphone et al. (2010): Intrinsic fluoroquinolone resistance in *Orientia tsutsugamushi*. In: *International journal of antimicrobial agents* 35 (4), S. 338–341. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.11.019.

150. Tantibhedhyangkul, Wiwit; Matamnan, Sutthicha; Longkunan, Asma; Boonwong, Chawikan; Khowawisetsut, Ladawan (2021): Endothelial Activation in *Orientia tsutsugamushi* Infection Is Mediated by Cytokine Secretion From Infected Monocytes. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11, S. 683017. DOI: 10.3389/fcimb.2021.683017.
151. Tantibhedhyangkul, Wiwit; Wongsawat, Ekkarat; Silpasakorn, Saowaluk; Waywa, Duangdao; Saenyasiri, Nuttawut; Suesuay, Jintapa et al. (2017): Use of Multiplex Real-Time PCR To Diagnose Scrub Typhus. In: *J Clin Microbiol* 55 (5), S. 1377–1387. DOI: 10.1128/JCM.02181-16.
152. Taylor, Andrew J.; Paris, Daniel H.; Newton, Paul N. (2015): A Systematic Review of Mortality from Untreated Scrub Typhus (*Orientia tsutsugamushi*). In: *PLoS Negl Trop Dis* 9 (8), e0003971. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003971.
153. Thapa, Dilli Ram; Tao, Xiabin; Fan, Feng; Tao, Zhengru (2018): Aftershock analysis of the 2015 Gorkha-Dolakha (Central Nepal) earthquake doublet. In: *Heliyon* 4 (7), e00678. DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e00678.
154. Thapa, Sangita; Hamal, Pradip; Chaudhary, Navin Kumar; Sapkota, Lokendra Bahadur; Singh, Jaya Prasad (2020): Burden of scrub typhus among patients with acute febrile illness attending tertiary care hospital in Chitwan, Nepal. In: *BMJ Open* 10 (9), e034727. DOI: 10.1136/bmjopen-2019-034727.
155. Thi Hai Yen, Nguyen; Kim, Chaewon; Jeong, Seonyoung; Jeon, Kyeongseok; Choi, Hooncheol; Ro, Hyo-Jin et al. (2019): Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus Infection or Mixed Infection with Scrub Typhus in South Korea in 2000-2003. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 101 (5), S. 1096–1099. DOI: 10.4269/ajtmh.19-0392.
156. Traub, R.; Wisseman, C. L. (1974): Current concepts of the ecology of chigger-borne rickettsiosis (scrub typhus). In: *Japanese journal of medical science & biology* 27 (1), S. 1–5. DOI: 10.7883/yoken1952.27.1.

157. Tsai, Ming-Hsien; Chang, Chung-Hsing; Tsai, Rong-Kung; Hong, Yi-Ren; Chuang, Tsung-Hsien; Fan, Kan-Tang et al. (2016): Cross-Regulation of Proinflammatory Cytokines by Interleukin-10 and miR-155 in *Orientia tsutsugamushi*-Infected Human Macrophages Prevents Cytokine Storm. In: *The Journal of investigative dermatology* 136 (7), S. 1398–1407. DOI: 10.1016/j.jid.2015.11.034.
158. Tseng, Bo-Yuan; Yang, Hui-Hua; Liou, Ji-Hung; Chen, Li-Kuang; Hsu, Yung-Hsiang (2008): Immunohistochemical Study of Scrub Typhus: A Report of Two Cases. In: *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 24 (2), S. 92–98. DOI: 10.1016/S1607-551X(08)70103-7.
159. Twartz, J. C.; Shirai, A.; Selvaraju, G.; Saunders, J. P.; Huxsoll, D. L.; Groves, M. G. (1982): Doxycycline prophylaxis for human scrub typhus. In: *The Journal of infectious diseases* 146 (6), S. 811–818. DOI: 10.1093/infdis/146.6.811.
160. Upadhyaya, B. P.; Shakya, G.; Adhikari, S.; Rijal, N.; Acharya, J.; Maharjan, L.; Marasini, B. R. (2016): Scrub Typhus: An Emerging Neglected Tropical Disease in Nepal. In: *Journal of Nepal Health Research Council* 14 (33), S. 122–127.
161. Varghese, George M.; Janardhanan, Jeshina; Mahajan, Sanjay K.; Tariang, David; Trowbridge, Paul; Prakash, John A. J. et al. (2015): Molecular epidemiology and genetic diversity of *Orientia tsutsugamushi* from patients with scrub typhus in 3 regions of India. In: *Emerging Infectious Diseases* 21 (1), S. 64–69. DOI: 10.3201/eid2101.140580.
162. Varghese, George M.; Janardhanan, Jeshina; Trowbridge, Paul; Peter, John V.; Prakash, John A. J.; Sathyendra, Sowmya et al. (2013): Scrub typhus in South India: clinical and laboratory manifestations, genetic variability, and outcome. In: *International journal of infectious diseases: IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 17 (11), e981-7. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.05.017.
163. Vincent, Gemma (2016): Scrub Typhus and Its Causative Agent, *Orientia tsutsugamushi*. In: Sunil Thomas (Hg.): *Rickettsiales. Biology, Molecular*

- Biology, Epidemiology, and Vaccine Development. Cham, s.l.: Springer International Publishing, S. 329–372.
164. Walsh, D. S.; Myint, K. S.; Kantipong, P.; Jongsakul, K.; Watt, G. (2001): *Orientia tsutsugamushi* in peripheral white blood cells of patients with acute scrub typhus. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 65 (6), S. 899–901. DOI: 10.4269/ajtmh.2001.65.899.
165. Walsh, Douglas S.; Delacruz, Eduardo C.; Abalos, Rodolfo M.; Tan, Esterlina V.; Jiang, Ju; Richards, Allen L. et al. (2007): Clinical and histological features of inoculation site skin lesions in cynomolgus monkeys experimentally infected with *Orientia tsutsugamushi*. In: *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 7 (4), S. 547–554. DOI: 10.1089/vbz.2006.0642.
166. Wangrangsimakul, Tri; Phuklia, Weerawat; Newton, Paul N.; Richards, Allen L.; Day, Nicholas P. J. (2020): Scrub Typhus and the Misconception of Doxycycline Resistance. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 70 (11), S. 2444–2449. DOI: 10.1093/cid/ciz972.
167. Watt, George; Chouriyagune, Charoen; Ruangweerayud, Ronnatrai; Watcharapichat, Pochaman; Phulsuksombati, Duangporn; Jongsakul, Krisada et al. (1996): Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand. In: *The Lancet* 348 (9020), S. 86–89. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)02501-9.
168. Watt, George; Parola, Philippe (2003): Scrub typhus and tropical rickettsioses. In: *Current opinion in infectious diseases* 16 (5), S. 429–436. DOI: 10.1097/00001432-200310000-00009.
169. Wee, Ian; Lo, Adeline; Rodrigo, Chaturaka (2017): Drug treatment of scrub typhus: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. In: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 111 (8), S. 336–344. DOI: 10.1093/trstmh/trx066.
170. Weitzel, Thomas; Dittrich, Sabine; López, Javier; Phuklia, Weerawat; Martinez-Valdebenito, Constanza; Velásquez, Katia et al. (2016):

- Endemic Scrub Typhus in South America. In: *The New England journal of medicine* 375 (10), S. 954–961. DOI: 10.1056/NEJMoa1603657.
171. Wi, Yu Mi; Woo, Hye in; Park, Dahee; Lee, Keun Hwa; Kang, Cheol-In; Chung, Doo Ryeon et al. (2016): Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome in Patients Suspected of Having Scrub Typhus. In: *Emerging Infectious Diseases* 22 (11), S. 1992–1995. DOI: 10.3201/eid2211.160597.
172. World Health Organization (1999): WHO Recommended Surveillance Standards. Second Edition. Hg. v. World Health Organization Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Geneva.
173. Xu, Guang; Mendell, Nicole L.; Liang, Yuejin; Shelite, Thomas R.; Goetz-Rivillas, Yenny; Soong, Lynn et al. (2017): CD8+ T cells provide immune protection against murine disseminated endotheliotropic *Orientia tsutsugamushi* infection. In: *PLoS Negl Trop Dis* 11 (7), e0005763. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005763.
174. Yoo, Jeong Rae; Heo, Sang Taek; Kang, Ji-Hoon; Park, Dahee; Kim, Jeong Soon; Bae, Jeong Hoon et al. (2018): Mixed Infection with Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus and Two Genotypes of Scrub Typhus in a Patient, South Korea, 2017. In: *The American journal of tropical medicine and hygiene* 99 (2), S. 287–290. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0088.
175. Yoshikawa, Tomoki; Fukushi, Shuetsu; Tani, Hideki; Fukuma, Aiko; Taniguchi, Satoshi; Toda, Shoichi et al. (2014): Sensitive and specific PCR systems for detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains and prediction of patient survival based on viral load. In: *Journal of clinical microbiology* 52 (9), S. 3325–3333. DOI: 10.1128/JCM.00742-14.
176. Yu, Xue-Jie; Liang, Mi-Fang; Zhang, Shou-Yin; Liu, Yan; Li, Jian-Dong; Sun, Yu-Lan et al. (2011): Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. In: *The New England journal of medicine* 364 (16), S. 1523–1532. DOI: 10.1056/NEJMoa1010095.

8. Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrenden

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Adamkiewicz, Albers, Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Bäumlein, Becker, Best, Bette, Bien, Bliemel, Bonaterra, Bösner, Brehm, Brüning, Bücking, Carl, Cetin, Czubayko, Daut, Decher, Del Rey, Dettmeyer, Dietz, Dinges, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhart, Eggers, El-Zayat, Engenhardt-Cabillic, Eschbach, Eubel, Fendrich, Feuser, Figiel, Frink, Fritz, Fuchs-Winkelmann, Geks, Geraedts, Görg, Gress, Grgic, Grimm, Grundmann, Haas, Halaszovich, Hertl, Hildebrandt, Hoch, Hofmann, Holst, Holzer, Hoyer, Irsusi, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießer, Karatolios, Keller, Kill, Kinscherf, Kircher, Kirschbaum, Kluge, Knipper, Kolb-Niemann, Kortus-Götze, Kostev, Köhler, König, Kruse, Kühnert, Lechler, Leonhardt, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Mann, Maurer, Meißner, Menzler, Metzelder, Meyer, Meyer-Wittkopf, Milani, Mittag, Moll, Moosdorf, Morin, Mueller, Mutters, Nenadic, Neubauer, Neumüller, Nikolaizik, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oberwinkler, Oertel, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Pankuweit, Parahuleva, Patrascan, Peterlein, Pfestroff, Pfützner, Plant, Preisig-Müller, Reese, Renz, Richter, Riera Knorrenschild, Rinne, Riße, Roelcke, Roeßler, Rost, Ruchholtz, Sachs, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schierl, Schneider, Schoner, Schratt, Schu, Schütz, Schulze, Schütt, Schüttler, Schwalbe, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sohlbach, Sommer, Stahl, Steinfeldt, Steiniger, Strik, Stuck, Swaid, Tackenberg, Teymoortash, Thieme, Thum, Timmermann, Timmesfeld, Trenker, Vannucchi, Vogelmeier, Vogt, Vorwerk, Wagner, Walter, Wächter, Weber, Weihe, Westermann, Wiesmann, Wilhelm, Wißniowski, Wolff, Worzfeld, Wrocklage, Wulf, Zavorotny, Ziring, Zwioerek.

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei PD Dr. Christian Keller bedanken, der mir dieses ungemein interessante Promotionsthema zur Verfügung gestellt und mich während der gesamten Zeit der Erstellung dieser Dissertation begleitet hat. Danke Christian für Dein unglaubliches Fachwissen, die wertvollen Anregungen, die regelmäßigen Gespräche und deine allzeitige Unterstützung.

Mein großer Dank gilt dem *Kathmandu Research Institute for Biological Science*, insbesondere PhD Anurag Adhikari. Dank der Zusammenarbeit mit den Kolleg:innen, den teilnehmenden Patient:innen und Blutspender:innen aus Nepal konnte diese Arbeit überhaupt zustande kommen.

Der Laborgemeinschaft möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, besonders Dr. Zacharias Orfanos. Danke Zac für Deine geduldigen Erklärungen und offenen Ohren. Stellvertretend für das Team der Virusdiagnostik möchte ich mich ganz herzlich bei Inge Lettermann-Nass bedanken. Danke für die stetige Hilfe bei der technischen Durchführung und die lieben Worte. Dank gilt dem Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, vor allem Dr. Markus Eickmann und Katharina Kowalski für ihre freundliche Unterstützung. Dr. Kirsten Dietze (Biolegend) ist für die Hilfe bei der Etablierung der FACS Multiparametermessung zu danken.

Für die finanzielle Förderung und das Stipendium möchte ich mich beim Deutschen Zentrum für Infektionsforschung bedanken.

Riesiger Dank gilt Johanna Schwarz für ihre unerschöpfliche Hilfsbereitschaft, ihre Zuverlässigkeit, ihre unfassbare Geduld und ihre klugen Ratschläge. Deine mühevollen Unterstützung, Dein aufmerksamer Blick und die von Dir ausgestrahlte Ruhe haben die Vervollendung dieser Arbeit möglich gemacht.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Freund:innen und all den lieben Menschen bedanken, die mir die ganzen Jahre durch das Studium und darüber hinaus zur Seite gestanden haben. Danke für eure Motivation, die unheimlich schöne Zeit und die vielen Erinnerungen.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir uneingeschränkten Rückhalt geben. Meiner Schwester Maryam danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdlichen Ermutigungen zum Weitermachen. Ohne euch wäre diese Doktorarbeit niemals entstanden. Danke für eure Liebe, euer Verständnis, Vertrauen und eure Gewissheit, dass alles erreichbar ist.