



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/30177 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. August 1997 (21.08.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00311 (22) Internationales Anmeldedatum: 14. Februar 1997 (14.02.97) (30) Prioritätsdaten: 196 05 475.3 14. Februar 1996 (14.02.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KNEBEL-DOEBERITZ, Magnus von [DE/DE]; Rainweg 93, D-69118 Heidelberg (DE). MAIWALD, Matthias [DE/DE]; Langgewann 40, D- 69121 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht • <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: PROCESS FOR RECOGNIZING THE RISK OF BECOMING ILL AFTER AN ARTHROPOD BITE (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ERKENNUNG DES ERKRANKUNGSRISIKOS NACH ARTHROPODENSTICH (57) Abstract The invention concerns a process for recognizing the risk of falling ill after an arthropod bite, said process being characterized in that, after the prick or bite of a host by an arthropod, nucleic acid of the host and nucleic acid of the pathogen passed along by the arthropod are demonstrated to be present in the latter. Furthermore, the invention concerns a kit suited for the purpose of carrying out the process. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erkennung des Erkrankungsrisikos nach Arthropodenstich, das dadurch gekennzeichnet ist, daß nach Stich oder Biß eines Wirts durch einen Arthropoden in letzterem das Vorliegen von Nukleinsäure des Wirts und von Nukleinsäure eines durch den Anthropoden übertragenen Krankheitserregers nachgewiesen wird. Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zur Erkennung des Erkrankungsrisikos nach Arthropodenstich

Die vorliegende Erfindung betrifft den Nachweis einer Nukleinsäure eines durch einen Arthropoden gestochenen Wirts und einer Nukleinsäure eines durch den Arthropoden übertragenen Krankheitserregers im Arthropoden. Ferner betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Nachweises geeigneten Kit.

5

Es gibt weltweit eine Vielzahl von Arthropoden, die menschliche oder tierische Wirte durch Stich oder Biß befallen. Diese Arthropoden sind Überträger einer Vielzahl von Krankheitserregern, z.B. Viren, Bakterien, Protozoen oder Würmern. Der bekannteste von Arthropoden, insbesondere Zecken, übertragene Krank-

10 heitserreger ist *Borrelia burgdorferi*, der Lyme-Borreliose hervorruft. Im Nachfolgenden werden die Zusammenhänge und Abläufe bei einem Arthropoden-, insbesondere Zeckenstich, am Beispiel der Lyme-Borreliose erklärt.

15

Die Lyme-Borreliose ist eine Erkrankung, welche durch Zeckenstich übertragen wird und in weiten Teilen der nördlichen Hemisphäre vorkommt. In Mitteleuropa und in Nordamerika ist es die häufigste durch Arthropoden übertragene Erkrankung. Die Befallsrate von Zecken mit dem Erreger *Borrelia burgdorferi* zeigt regionale Schwankungen. Aus den USA werden Befallsraten von bis zu 55% berichtet, während für Europa Berichte über Befallszahlen zwischen 2,5% und

20 36% existieren.

25

Der Krankheitsverlauf der Lyme-Borreliose ist stadienhaft. Nach Zeckenstich erfolgt mit einer Inkubationszeit von mehreren Tagen bis wenigen Wochen zunächst eine Lokalinfektion (Stadium I; Erythema migrans), im weiteren Verlauf eine Erregergeneralisation (Stadium II; Symptome am Nervensystem, am Herzen oder an Gelenken) und nach Monaten oder Jahren eine Organmanifestation

(Stadium III, spätes Stadium; Lyme-Arthritis oder Acrodermatitis chronica atrophicans). Einzelne Erkrankungsstadien können auch übersprungen werden oder es kann zur spontanen Ausheilung kommen.

5 Insgesamt ist sowohl die klinische als auch die Labordiagnostik der Lyme-Borreliose schwierig und in einigen Krankheitsfällen mit großer Unsicherheit behaftet. Da der direkte Nachweis des Erregers in Materialien von Patienten als unzuverlässig gilt, werden meist serologische Verfahren als Hilfestellung für die Diagnose verwendet. In frühen Krankheitsstadien werden jedoch häufig nicht erhöhte
10 Antikörpertiter gefunden, obwohl eine Infektion stattgefunden hat, so daß hier die Serologie bisweilen kein verlässliches Kriterium darstellt. Dies trifft teilweise sogar auf die Neuroborreliose zu, die ein bedrohliches Krankheitsbild darstellen kann und deren Abgrenzung von neurologischen Erkrankungen anderer Ursache von großer Bedeutung ist.

15 Die dem Stand des Wissens entsprechende Therapie der Lyme-Borreliose erfolgt ab dem Stadium II der Erkrankung durch intravenöse Verabreichung von Antibiotika. Eine solche Verabreichung erfordert entweder tägliche Arztbesuche oder die stationäre Aufnahme des Patienten im Krankenhaus. Allein die Kosten für die
20 verabreichten Antibiotika betragen derzeit etwa 2500,- bis 5000,- DM pro Therapiezyklus. Teilweise werden sehr aggressive Krankheitsverläufe beobachtet, die mehrere Therapiezyklen erfordern und damit sehr hohe Behandlungskosten verursachen.

25 Angaben über das Infektionsrisiko nach Zeckenstich sind bislang spärlich und meist ohne Bezug zur Positivität oder Negativität der Zecke ermittelt worden. Amerikanische Untersuchungen gehen davon aus, daß 1-3% der Zeckenstiche in Endemiegebieten zur Infektion mit *Borrelia burgdorferi* führt. Dabei kommen Magid et al., N. Engl. J. Med. 327, (1992), 534-541 in einer statistischen
30 Kosten-Nutzen-Analyse zu dem Schluß, daß es in Gebieten mit sehr hoher Durchseuchung der Zecken mit *Borrelia burgdorferi* sinnvoll sei, nach jedem Zeckenstich prophylaktisch Antibiotika zu verabreichen. In Deutschland wird

derzeit eine Antibiotikaphylaxe nach Zeckenstich abgelehnt. Anstelle dessen wird empfohlen, erst beim Auftreten von Symptomen einer Lyme-Borreliose gezielt eine Therapie einzuleiten. Diese Empfehlung besitzt zwei wesentliche Nachteile: (1) Einzelne Stadien der Erkrankung (z. B. Erythema migrans) können übersprungen werden und die Erkrankung kann mit den schwierig zu diagnostizierenden und teuer zu therapierenden Symptomen des Stadium II oder III beginnen. (2) Wenn es eine zuverlässige Möglichkeit gibt, früh nach Zeckenstich das Infektionsrisiko abzuschätzen, ist es unter ethischen Gesichtspunkten kaum zu rechtfertigen, Patienten dem Risiko einer Erkrankung und den damit verbundenen Leiden auszusetzen. Zu diesen Nachteilen kommt hinzu, daß eine Antibiotikaphylaxe oder die Therapie einer frühen Infektion wesentlich einfacher und kostengünstiger durchzuführen ist als die Therapie einer Infektion zum späteren Zeitpunkt.

Bislang gibt es kaum Kriterien, das Erkrankungsrisiko für einen individuellen Wirt nach individuellem Arthropodenstich oder -biß zuverlässig abschätzen zu können und daraus eine Indikation zur prophylaktischen Behandlung ableiten zu können. Bei der Lyme-Borreliose sind die bisherigen Empfehlungen zum Verhalten nach Zeckenstich vor dem Hintergrund entstanden, daß konventionelle Nachweisverfahren für *Borrelia burgdorferi* in Zecken, wie Kultur, Dunkelfeldmikroskopie oder direkte Immunfluoreszenz, keine ausreichende Zuverlässigkeit besitzen. Ursache dafür ist einerseits die geringe Sensitivität der Verfahren und andererseits, daß Blutbestandteile in Zecken, die bereits mit dem Saugvorgang begonnen haben, diese Nachweisverfahren in erheblichem Maße stören. Somit war es bislang mit konventionellen Methoden nicht mit ausreichender Sicherheit möglich, das aus einem Zeckenstich für den betroffenen Menschen resultierende Infektionsrisiko festzustellen.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem es möglich ist, direkt nach Arthropodenstich bzw. -biß beim betroffenen Wirt oder Patienten eine möglichst genaue Abschätzung des Risikos vornehmen zu können, ob dieser eine durch Arthropoden übertragene

Erkrankung bekommen wird und in Abhängigkeit von der ermittelten Höhe des Risikos eine Prophylaxe, insbesondere mit Antibiotika, vornehmen zu können.

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Verfahren gemäß Anspruch 1 erreicht.
5 Vorteilhafte Ausgestaltungen wie auch einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Erkenntnis der Anmelderin, daß
10 im Rahmen eines Stichs oder Bisses durch einen Arthropoden zum einen Bestandteile des Wirts vom Arthropoden aufgenommen werden, und zum anderen Bestandteile vom Arthropoden an den Wirt abgegeben werden. Unter den vom Arthropoden an den Wirt abgegebenen Bestandteilen können auch die erwähnten Krankheitserreger sein. So kann man durch Untersuchung des Arthropoden darauf schließen, ob dieser Bestandteile des Wirts aufgenommen hat und gleichzeitig
15 Krankheitserreger beherbergt.

Der Nachweis einer Nukleinsäure des Wirts und solcher eines durch den Arthropoden übertragenen Krankheitserregers im Arthropoden erfolgt durch übliche
20 Verfahren, vorzugsweise mittels PCR. Für eine PCR wird der Arthropode vom Wirt entfernt und Nukleinsäure aus dem Arthropoden isoliert. Diese wird unter Verwendung geeigneter Primer für die Wirts-Nukleinsäure bzw. solcher für die Nukleinsäure eines Krankheitserregers amplifiziert und die Amplifikationsprodukte werden nachgewiesen, wobei die einzelnen Schritte getrennt oder gemeinsam
25 erfolgen können. Mittels dieser Diagnostik kann das Infektionsrisiko für den Wirt sicher vorausgesagt werden.

Der Ausdruck "Nukleinsäure" umfaßt RNA und DNA, der Ausdruck "Wirt" Tiere
30 und Menschen. Ferner umfaßt der Ausdruck "Arthropode" Insekten, insbesondere Zecken und Mücken, Spinnen und Krebse. Desweiteren umfaßt der Ausdruck "Krankheitserreger" Viren, Bakterien, Protozen und Würmer.

Durch den Nachweis sowohl von Nukleinsäure-Sequenzen des Wirts als auch

von erregerspezifischen Nukleinsäure-Sequenzen im Arthropoden, gegebenenfalls in Kombination, ist eine wesentlich genauere Abschätzung des Erkrankungsrisikos nach Arthropodenstich oder -biß möglich als dies bei Anwendung konventioneller Erreger-Nachweisverfahren, wie Kultur oder Mikroskopie, oder auch
5 beim alleinigen Nachweis von Nukleinsäure des Erregers im Wirt der Fall wäre.

Nachstehend wird das erfindungsgemäße Verfahren beispielhaft zum Nachweis von Zecken beschrieben, die *Borrelia burgdorferi*, den Erreger der Lyme-Borreliose tragen. Dieser Erreger liegt im Mitteldarm der Zecken, nicht jedoch oder nur
10 selten im Speichel dieser vor. In einer ersten Phase nach Zeckenstich wird Zeckenspeichel in die Stichwunde eingebracht, welcher anästhesierende und gewebsverflüssigende Eigenschaften besitzt. In einer zweiten Phase werden Blut und Gewebsbestandteile angesaugt. In dieser Phase kommt es oftmals zur Regurgitation von Mitteldarminhalt, welcher Krankheitserreger, insbesondere
15 Borrelien, enthalten kann, in die Stichwunde. Somit folgt die Übertragung des Erregers erst nach einem Ansaugen menschlicher Zellbestandteile, so daß bei der Anwesenheit von menschlicher Nukleinsäure in der Zecke von einem höheren Übertragungsrisiko ausgegangen werden kann. Diese Beziehung wird untermauert durch tierexperimentelle Untersuchungen, die eine klare Beziehung
20 zwischen Saugdauer der Zecken und Übertragungshäufigkeit des Erregers zeigen. Nur wenn die Zecke lang genug Blut ansaugen kann, findet sich dieses auch im Zeckenkörper wieder und eine lange Aufenthaltsdauer der Zecke am Wirt vergrößert auch das Risiko, daß es zur Übertragung von Krankheitserregern kommt.

25 Nach Gewinnung von Nukleinsäure, insbesondere DNA, aus einem von einem Wirt entfernten Arthropoden, insbesondere einer Zecke, wird diese in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei besteht die Möglichkeit, in einer ersten PCR-Reaktion zuerst ein Primersystem für die vom Arthropoden übertragenen Krankheitserreger, insbesondere *Borrelia burgdorferi*, zu verwenden und in einer nachfolgenden PCR-Reaktion ein Primersystem für ein wirtsspezifisches Gen, z.B. für
30 ein menschliches Gen, insbesondere c-myc-Onkogen oder Aktigen, zu ver-

- 6 -

wenden. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, die Amplifikation in einer einzigen PCR-Reaktion durchzuführen. Die Durchführung der PCR-Reaktion erfolgt anhand der dem Fachmann bekannten Standardbedingungen.

5 Als Primersystem für *Borrelia burgdorferi*-DNA kommt beispielsweise in Frage: JS1 (5'-AGAAGTGCTGGAGTCGA-3'), JS2 (5'-TAGTGCTCTACCTCTATTAA-3') und FS1 (5'-AGTCTGTTTAAAAAGGCA) (Schwartz, J. et al., J. Clin. Microbiol. 30, (1992), 3082-3088).

10 Als Primersystem für die DNA eines menschlichen c-myc-Onkogens kommt beispielsweise in Frage:
o1 (5'-CTGGTTTTCCACTACCCGAA-3'), o2 (5'-CCGCAACCCTTGCCGCATCC-3') und o3 (5'-GACGCGGGGAGGCTATTCTG-3') (Wolf, J. et al., Cancer Res. 50, (1990), 3095-3100).

15

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird die durch PCR amplifizierte DNA auf z.B. einem 5-10% igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran, z.B. Nylonmembran, übertragen. Nach Fixierung der DNA auf der Membran wird diese in einer oder mehreren Hybrisierungsreaktionen mit radioaktiv markierten

20 Fragmenten, die entweder für einen vom Arthropoden übertragenen Krankheitserreger, insbesondere *Borrelia burgdorferi*, spezifisch sind oder für den Wirt (Patient) spezifisch sind, eingesetzt. Nach Auswertung eines aufgelegten Röntgenfilms kann für den Wirt (Patient) entschieden werden, ob der Arthropode, der ihn gestochen hat, menschliche DNA als auch DNA eines Krankheitserregers

25 enthalten hat. Im Fall, daß in dem Arthropoden beide Sequenzen nachweisbar waren, sollte prophylaktisch eine Antibiotikabehandlung begonnen werden. Dies bedeutet, daß nur die Patienten behandelt werden brauchen, für die ein Erkrankungsrisiko besteht und nicht alle, die einen Anthropodenstich haben. Dies stellt einen großen Vorteil hinsichtlich Kosten und Belastung für den Patienten dar.

30

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit zur Durchführung vorstehender Verfahren bereitgestellt. Insbesondere handelt es sich um einen Kit für ein PCR-Verfahren,

- 7 -

wobei der Kit vorzugsweise Primer für menschliche Nukleinsäure, insbesondere DNA, ganz besonders für die DNA eines c-myc-Onkogens, und Primer für *Borrelia burgdorferi* Nukleinsäure, insbesondere DNA, sowie für die Durchführung einer PCR geeignete Puffer, Enzyme und Trägerstoffe enthält. Ganz besonders bevorzugt enthält der Kit vorstehend genannte Primersysteme.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand eines Beispiels näher erläutert.

Beispiel: Nachweis von *Borrelia burgdorferi* DNA und von menschlicher DNA in Zecken

Es wurden 22 Zecken untersucht, die Menschen gestochen hatten. Zum Nachweis von *Borrelia burgdorferi*-DNA und von menschlicher DNA in Zecken wurde eine Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung eines Primersystems für *Borrelia burgdorferi* und eines Primersystems für das menschliche c-myc-Onkogen durchgeführt. Die Oligonukleotide für *Borrelia burgdorferi* waren: JS1 (5'-AGAAGTGCTGGAGTCGA-3'), JS2 (5'-TAGTGCTCTACCTCTATTAA-3') und FS1 (5'-AGTCTGTTTAAAAAGGCA-3'). Diejenigen für das c-myc-Onkogen waren: o1 (5'-CTGGTTTTTCCACTACCCGAA-3'), o2 (5'-CCGCAACCCTTGCCGCATCC-3') und o3 (5'-GACGCGGGGAGGCTATTCTG-3'). Dabei wurden die bereits für Urinproben von Patienten publizierten Bedingungen für die Amplifikation mittels PCR und den Nachweis der PCR-Produkte angewandt (vgl. Maiwald et al., BIOforum 17, (1994), 232-237).

Ein PCR-Ansatz enthielt in 100 µl 50 mM KCl, 50 mM Tris (pH 9), 2,0 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs (Desoxynukleosid-Triphosphate), 500 nM jedes Primers und 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase (AmpliTaq® DNA Polymerase, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), sowie 70 µl Mineralöl. Als Probevolumen wurde 10 µl gewählt. Die Aufbereitung der Zecken für die PCR erfolgte, indem diese mit einem Skalpell zerteilt wurden, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurden, dort mit Hilfe eines Pistills (Kontres Instruments, USA) zerdrückt und dann mit 30 µl einer 20%igen Chelex-Suspension (Bio-Rad, USA) für 10 min aufgekocht wurden. Vom Überstand des Chelex-Harzes wurden 10 µl in die PCR-Reaktion

eingesetzt.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurden 30 μ l aus den PCR-Reaktionsansätzen mittels Elektrophorese auf 8 %-igen Polyacrylamidgelen (mit TBE-Puffer: 0.089 M Tris, 0.089 M Borsäure, 0.002 M EDTA) bei 12 V cm^{-1} für 2-3 h aufgetrennt und anschließend wurden die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt und auf einem UV-Transilluminator photographiert. Für die anschließende Hybridisierung wurde die DNA im Gel für 15 min denaturiert (0.2 M NaOH, 0.6 M NaCl), und danach für 2 x 15 min in 25 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) neutralisiert. Die DNA aus dem Gel wurde dann auf eine Nylon-Membran (Sartolon, 0.2 μ m Porengröße, Fa. Sartorius) mittels Elektroblob in TBE-Puffer bei 110 mA über Nacht transferiert.

Nach Hitzefixierung der DNA auf der Membran (80° C, 2 h) wurde die Membran bei 47 °C für mindestens 2 h prähybridisiert (in 0.9 M NaCl, 6 mM EDTA, 90 mM Tris, 1% SDS mit 1 g/l Hefe-RNA) und anschließend über Nacht bei 47° C mit dem durch Kinasereaktion (Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989)) mit ^{32}P markierten Oligonukleotid FS1 (spezifisch für *Borrelia burgdorferi*; vgl. vorstehend) in 10 ml der Prähybridisierungslösung hybridisiert. Die Nylonmembran wurde anschließend in einer Lösung aus 3 x SSC (20 x SSC ist 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7.2), 5% SDS and 10 mM Natriumphosphat (pH 7.0) bei 47° C für 10 min gewaschen, dann noch einmal in 1 x SSC, 1% SDS bei 47° C für 10 min gewaschen, und anschließend mit einem Röntgenfilm (X-OMAT AR, Kodak, USA) in einer Kassette exponiert.

Es wurden sechs Zecken identifiziert, die *Borrelia burgdorferi*-DNA und menschliche DNA aufwiesen. Von den entsprechenden sechs Patienten entwickelten drei nach klinischen und serologischen Kriterien eine Lyme-Borreliose. Somit erweist sich der Nachweis von *Borrelia burgdorferi*-DNA zusammen mit menschlicher DNA in Zecken als geeignet, den durch eine Infektion gefährdeten Personenkreis einzugrenzen.

Ein weiteres Kollektiv von 71 Zecken, die an Patienten gesaugt hatten und deren Saugdauer protokolliert worden war, wurden auf die Anwesenheit des menschlichen *c-myc*-Gens mittels des oben beschriebenen PCR-Verfahrens untersucht. Für die Hybridisierungsreaktion wurde das ³²P markierte Oligonukleotid o3 (spezifisch für menschliches *c-myc*-Onkogen; vgl. vorstehend) als Hybridisierungsprobe eingesetzt. In Abhängigkeit von der Saugdauer zeigten sich folgende Ergebnisse: (1) 0-4 h Saugdauer: 3 von 13 Zecken positiv (d.h. es konnte menschliche DNA in der Zecke nachgewiesen werden); (2) 5-12 h: 2 von 11 Zecken positiv; (3) 13-24 h: 2 von 18 Zecken positiv; (4) 25-48 h: 8 von 19 Zecken positiv; (5) länger als 48 h: 3 von 5 Zecken positiv. Somit konnte gezeigt werden, daß mit zunehmender Saugdauer der Zecken die Wahrscheinlichkeit der Anwesenheit menschlicher DNA in Zecken statistisch signifikant zunimmt.

5

Patentansprüche

5

10

15

20

25

1. Verfahren zur Erkennung des Erkrankungsrisikos nach Arthropodenstich, dadurch gekennzeichnet, daß nach Stich oder Biß eines Wirts durch einen Arthropoden in letzterem das Vorliegen von Nukleinsäure des Wirts und von Nukleinsäure eines durch den Arthropoden übertragenen Krankheitserregers nachgewiesen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure DNA ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der Wirts-Nukleinsäure und solcher des Krankheitserregers mittels PCR erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Arthropoden um eine Zecke oder eine Mücke handelt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem von einem Arthropoden übertragenen Krankheitserregers um Viren, Bakterien, Protozoen oder Würmer handelt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Krankheitserreger um *Borrelia burgdorferi* handelt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Wirt um einen Menschen handelt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR bezüglich

der Wirts-DNA Primer für menschliches C-myc-Onkogen verwendet werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer folgende Sequenz haben:

5 o1: 5'-CTGGTTTTTCCACTACCCGAA-3',
o2: 5'-CCGCAACCCTTGCCGCATCC und/oder
o3: 5'-GACGCGGGGAGGCTATTCTG-3'.

10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß in der PCR bezüglich der DNA des Krankheitserregers Primer für *Borrelia burgdorferi* verwendet werden.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer folgende Sequenz haben:

15 JS1: 5'-AGAAGTGCTGGAGTCGA-3', JS2:
5' - T A G T G C T C T A C C T C T A T T A A - 3' und/oder FS1:
5'-AGTCTGTTTAAAAAGGCA-3'.

- 20 12. Kit zur Durchführung des Verfahren nach einem der Ansprüche 2-11, umfassend Primer für menschliche DNA, insbesondere für C-myc-Onkogen, und solche für *Borrelia burgdorferi* DNA sowie zur Durchführung einer PCR notwendigen Puffer, Enzyme und Trägerstoffe.