

### 3 Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material und Methoden

##### 3.1.1 Untersuchungsgebiet

Das Stadtgebiet von Berlin umfaßte vor der Stadtgebietsreform 23 Stadtbezirke unterschiedlicher Größe und erstreckt sich über eine Gesamtfläche von 89141 ha. In der Tabelle 3 sind die Stadtgebietsflächen (Sgf) aufgeführt, die die Biotope von Füchsen darstellen.

Anhand der Tabelle wird deutlich, daß es sich bei den Stadtbezirken aus denen die meisten Füchse in die eigenen Untersuchungen eingeflossen sind (Köpenick, Pankow, Spandau, Reinickendorf, Zehlendorf), um die Bezirke mit den prozentual größten Wald-, Feld und Erholungsflächen handelt. Mit Ausnahme von Pankow wiesen sie zudem eine überdurchschnittlich große Wasserfläche auf

Tabelle 3: die Fuchsstrecken der Jahre 1995/ 96 bis 1998/ 99 in Berlin

| <b>Jagdjahr</b> | <b>Fuchsstrecke (Anzahl)</b> |
|-----------------|------------------------------|
| 1995/ 96        | 330                          |
| 1996/ 97        | 241                          |
| 1997/ 98        | 260                          |
| 1998/ 1999      | 265                          |

(aus: Statistisches Jahrbuch 1997, 1998, 1999, 2000 für die Bundesrepublik Deutschland)

Wie aus der Tabelle 3 zu entnehmen ist, kam es vom Jagdjahr 1995/ 96 zum Jagdjahr 1996/ 97 zu einem Abfall der erlegten Füchse. Im Jagdjahr 1997/ 98 hingegen war ein geringfügiger Anstieg zu verzeichnen, der sich auch im Jagdjahr 1998/ 99 fortsetzte.

Tabelle 4: Anteil der Fuchsbiotope und der Wasserflächen in Bezug auf die Stadtgebietsfläche

| Bezirk               | Sgf insg.<br>(in ha) | Fuchsbiotope<br>(in ha) | In % zu<br>Sgf | Wasserfläche<br>(in ha) | in % zu<br>Sgf |
|----------------------|----------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|----------------|
| Mitte                | 1069                 | 118                     | 11,0           | 39                      | 3,6            |
| Tiergarten           | 1341                 | 320                     | 23,9           | 88                      | 6,6            |
| Wedding              | 1537                 | 375                     | 24,4           | 15                      | 1,0            |
| Prenzlauer Berg      | 1095                 | 104                     | 9,5            | -                       | -              |
| Friedrichshain       | 978                  | 199                     | 20,3           | 93                      | 9,5            |
| Kreuzberg            | 1038                 | 142                     | 13,7           | 23                      | 2,2            |
| Charlottenburg       | 3033                 | 809                     | 26,7           | 98                      | 3,2            |
| Spandau              | 9191                 | 3569                    | 38,8           | 879                     | 9,6            |
| Wilmersdorf          | 3439                 | 1796                    | 52,2           | 181                     | 5,3            |
| Zehlendorf           | 7053                 | 3026                    | 42,9           | 1067                    | 15,1           |
| Schöneberg           | 1229                 | 279                     | 22,7           | 2                       | 0,2            |
| Steglitz             | 3196                 | 428                     | 13,4           | 60                      | 1,9            |
| Tempelhof            | 4079                 | 968                     | 23,7           | 40                      | 0,1            |
| Neukölln             | 4493                 | 1126                    | 25,0           | 70                      | 1,6            |
| Treptow              | 4065                 | 1042                    | 25,6           | 39                      | 1,0            |
| Köpenick             | 12776                | 7608                    | 59,5           | 2126                    | 16,4           |
| Lichtenberg          | 2636                 | 454                     | 17,2           | 67                      | 2,5            |
| Weißensee            | 3015                 | 1341                    | 44,5           | 36                      | 1,2            |
| Pankow               | 6198                 | 3318                    | 53,3           | 105                     | 1,7            |
| Reinickendorf        | 8946                 | 3665                    | 41,0           | 732                     | 8,2            |
| Marzahn              | 3157                 | 468                     | 14,8           | 63                      | 2,0            |
| Hohenschönh.         | 2599                 | 903                     | 34,7           | 48                      | 1,8            |
| Hellersdorf          | 2979                 | 826                     | 27,7           | 57                      | 1,9            |
| <b>Berlin gesamt</b> | <b>89141</b>         | <b>33938</b>            | <b>38,1</b>    | <b>5927</b>             | <b>6,6</b>     |

\*: hierzu zählen Stadtgebietsflächen wie Parkanlagen, Kleingärten, Spielplätze, Bahn- und Flugplatzgelände, Landwirtschafts- und Waldflächen sowie Friedhöfe

### 3.1.2 Untersuchungsmaterial

Das Ziel der eigenen Untersuchungen bestand darin, Seren von Füchsen aus dem Stadtgebiet von Berlin, die in den Jahren 1996 – 1999 an das Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen (ILAT) im Rahmen der oralen Immunisierungskampagne gegen Tollwut eingesandt wurden, mittels des indirekten ELISA auf *Sarcoptes*-Antikörper zu untersuchen. Von den insgesamt im Untersuchungszeitraum eingesandten 1456 Füchsen konnten Serumproben von 1025 Tieren gewonnen werden. Hierbei wurden 10 ml des Blutes, das sich entweder im Thorax oder im Herzen befand, verwendet. Anschließend wurde das Blut zehn Minuten bei 3500 U/ min zentrifugiert und jeweils 0,5 ml des gewonnenen Serums bei – 20 °C gelagert.

Die im Rahmen der Sektion erhobenen klinischen Befunde wurden als Datensätze bei der Auswertung mit berücksichtigt, sowie das klinische Erscheinungsbild des untersuchten Tieres hinsichtlich Räude, d.h. ob es klinisch apparent oder inapparent war.

Des weiteren wurden als Negativkontrollen Seren von 44 Farmfüchsen des BgVV (Bundesamt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärwesen) als auch 66 Seren von Fuchsbeständen des Serumwerkes aus Dessau untersucht.

Als Positivkontrollen dienten die Seren von 17 Füchsen des staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Potsdam, und die von 8 Füchsen des Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes Frankfurt/ Oder. Weiterhin wurden von 5 Füchsen, die im Institut für Parasitologie und Tropenmedizin zur Untersuchung eingereicht worden sind und eine generalisierte Räude aufwiesen, Hautgeschabsel entnommen. Nach genauer Betrachtung unter dem Stereomikroskop und dem Nachweis von lebenden *Sarcoptes*-Milben konnte das Serum dieser Tiere auch als Positivkontrolle verwendet werden.

### 3.1.3 Serologische Untersuchungen

#### 3.1.3.1 Der ELISA zum Nachweis spezifischer AK gegen *Sarcoptes canis*

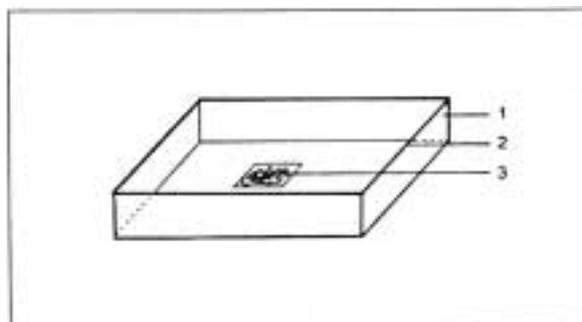
##### 3.1.3.1.1 Antigenpräparation

###### Isolierung der *Sarcoptes*-Milben

Die Isolierung der *Sarcoptes*-Milben erfolgte aus Hautgeschabseln von toten Rotfüchsen, die eine generalisierte Räude aufwiesen. Nach Abtragung der oberen Hautschichten an den betroffenen Stellen mittels eines scharfen Löffels wurden diese Proben in Petrischalen gesammelt und unter dem Stereomikroskop auf lebende *Sarcoptes*-Milben untersucht.

Mit Hilfe eines Auswanderungsverfahrens in Glaspetrischalen erfolgte die Isolierung der Milben aus den Hautgeschabseln. Dazu wurden die Geschabsel nach der Zerkleinerung mit der Schere auf eine Filterpapierscheibe aufgebracht, die anschließend in der Mitte der Petrischale plaziert wurde. Um ein Entweichen der Milben aus der Petrischale zu verhindern, wurden die oberen Schalenränder mit Kunststoffklebeband abgeklebt (Abb. 3).

Die Lagerung der Hautgeschabsel erfolgte für zwei Tage in einem Brutschrank bei 37°C, in dem zur Gewährleistung einer hohen Luftfeuchtigkeit zusätzlich noch mit Wasser gefüllte Schalen standen. Dadurch, daß die Milben über das Filterpapier auf die Glasfläche der Schalen auswanderten, streiften sie die an ihren Beinen und Borsten haftenden Hautschuppen und sonstigen Wirtspartikel, die eine Verunreinigung des *Sarcoptes*-Milbenantigens bewirkt hätten, weitgehend ab. Am nächsten Tag erfolgte eine Kontrolle der ausgewanderten Milben unter dem Stereomikroskop.



Isolierung von *Sarcoptes*milben aus Hautgeschabseln (1: Petrischale; 2: Vaseline;  
3: Filterpapier mit Hautgeschabseln)

### Abbildung 3: Isolierung von *Sarcoptes*-Milben aus Hautgeschabseln (nach SOBEK 1998)

Um die Milben vom Boden der Petrischale einzusammeln, wurde das Filterpapier mit zwei Pinzetten entfernt und die Milben mit Hilfe eines Objektträgers zusammengeschoben. Mittels eines Pinsels bzw. einer feinen Nadel wurden die gesammelten Milben unter Zusatz von 0,05 M Carbonat-Puffer (pH 9,6, siehe Rezepturanhang) in Eppendorfreaktionsgefäße verbracht und mit Carbonat-Puffer gewaschen. In Anschluß daran wurde, nach einer zehn minütigen Zentrifugation bei 3000 U/ min, der Überstand abgesaugt und die Eppendorfggefäße erneut mit Carbonat-Puffer aufgefüllt. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Vorgangs und erneutem Auffüllen der Eppendorfreaktionsgefäße mit Carbonatpuffer wurden diese dann bei – 20°C gelagert.

### Herstellung des Milben-Ganzkörperextraktes

Die Milbensuspension wurde nach dem Auftauen unter Zugabe von Carbonat-Puffer und dem Proteinaseinhibitor 1µl N-p-Tosyl-Lysine Chloromethyl Ketone (TLCK; T-7254; 0,1 M Stocklösung in H<sub>2</sub>O), welches die Proteindenaturierung durch Enzyme, die bei der Zerkleinerung der Milben frei werden, verhindert, in einen Teflon Homogenisator umgefüllt. Die Zerkleinerung der Milben erfolgte unter ständiger Kühlung im Eisbad. Der Zerkleinerungsgrad wurde anhand eines Tropfens der entstandenen Suspension mikroskopisch untersucht. Die weitere Zerkleinerung fand nach dem Umfüllen dieser Suspension in ein Glaszentrifugenröhrchen mittels Ultraschall (Braunson Sonifier 250: drei mal 30 Sekunden, „duty cycle“ 15 %, „output-control“ 1-2) unter weiterer Kühlung in einem Eiswasserbad statt. Anschließend wurde diese Suspension bei 13000 U/ min zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei – 20°C gelagert und der Bodensatz, der nur noch Chitinreste enthielt, verworfen.

### Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Überstand erfolgte nach der Bichinolin-Carbonsäure-(BCA)-Mikrotiter-Methode (Firma Pierce, Niederlande) mit dem Photometer bei 570 nm, die für die Bestimmung eines Proteingehaltes zwischen 0,2 - 1,2 mg/ ml geeignet ist.

Mittels einer angefertigten Albumin-Standard Verdünnungsreihe wurde anhand der gemessenen Extinktionswerte eine Standardkurve erstellt. Nach der Messung der Extinktion des Überstandes konnte nun mit Hilfe der Albumin-Standardkurve der Proteingehalt bestimmt werden. Die Lagerung der Suspension erfolgte in 0,5 ml Portionen bei – 20 °C.

### Durchführung des ELISA

Als Test kam der von SOBEK (1998) zur Diagnostik der Räude beim Hund entwickelte indirekte ELISA unter Verwendung von Mikrotiterplatten mit Flachboden und mittlerer Bindungskapazität (Immunolon 1, Flat Bottom Plates, Cataloge No. 011-010-3350, Dynatech) zur Anwendung.

Dazu mußte zuvor die Mikrotiterplatte jedoch mit Antigenextrakt inkubiert werden.

Antigengewinnung: Der hergestellte *Sarcoptes*-Milben-Antigen-Extrakt wurde mit Carbonat-Puffer (0,05 M, pH 9,6) auf einen Proteingehalt von 2,5µg/ml eingestellt und die Mikrotiterplatte anschließend mit 100 µl des verdünnten Antigenextraktes pro Kavität beschichtet. Nun wurde die Platte für eine Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert und anschließend bei 4°C nochmals für zwanzig Stunden inkubiert. Nach dem Dekantieren des überschüssigen Antigens wurde die Platte drei mal fünf Minuten mit 200µl Phosphatpuffer (PBS) unter Zusatz von 0,05% Tween-20 (PBS-Tween) gewaschen. Die Lagerung der in Folie eingeschweißten, gebrauchsfertigen mit Antigen inkubierten Mikrotiterplatte erfolgte im Kühlschrank.

Vor der Beschickung der Platte mit den Seren mußte diese erst einmal mit Aqua dest. gewaschen und daraufhin für 20 Minuten mit 200 µl PBS-Tween 20 blockiert werden, damit die im Serum enthaltenen Antikörper nicht direkt an die freien Bindungsstellen der Polystyroloberfläche gebunden werden.

Jetzt wurden die zu untersuchenden Seren 1: 160 mit PBS-Tween 20 verdünnt und jeweils 100µl pro Kavität der Platte aufgetragen. Die Testung jedes Serums erfolgte im Doppelansatz und der Kontrollseren im Vierfachansatz (Abbildung 4). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler wurden die Seren dekantiert, die Platte einmal mit Aqua dest. und dreimal fünf Minuten mit je 200 µl PBS-Tween 20 auf dem Schüttler gewaschen.

|          | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> | <b>7</b> | <b>8</b> | <b>9</b> | <b>10</b> | <b>11</b> | <b>12</b> |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>A</b> | <b>P</b> | <b>P</b> | <b>P</b> | <b>P</b> | 14       | 14       | 22       | 22       | 30       | 30        | 38        | 38        |
| <b>B</b> | <b>N</b> | <b>N</b> | 7        | 7        | 15       | 15       | 23       | 23       | 31       | 31        | 39        | 39        |
| <b>C</b> | 1        | 1        | 8        | 8        | 16       | 16       | 24       | 24       | 32       | 32        | 40        | 40        |
| <b>D</b> | 2        | 2        | 9        | 9        | 17       | 17       | 25       | 25       | 33       | 33        | 41        | 41        |
| <b>E</b> | 3        | 3        | 10       | 10       | 18       | 18       | 26       | 26       | 34       | 34        | 42        | 42        |
| <b>F</b> | 4        | 4        | 11       | 11       | 19       | 19       | 27       | 27       | 35       | 35        | 43        | 43        |
| <b>G</b> | 5        | 5        | 12       | 12       | 20       | 20       | 28       | 28       | 36       | 36        | 44        | 44        |
| <b>H</b> | 6        | 6        | 13       | 13       | 21       | 21       | 29       | 29       | 37       | 37        | 45        | 45        |

Abbildung 4: ELISA-Platte 96-Loch, mögliche Aufteilung

P: Positivkontrollserum

N: Negativkontrollserum

1 – 45: Serumproben

Im nächsten Schritt erfolgte die Beschichtung der Platte mit 100 µl Konjugat pro Kavität (Peroxidase-konjugiertes Anti-Hund-IgG, whole molecule, Gebrauchslösung 1:1200, Firma Sigma). Nach erneuter Inkubation für eine Stunde auf dem Schüttler bei 37°C wurde der oben aufgeführte Waschvorgang mit Aqua dest. und PBS-Tween 20 wiederholt.

Im letzten Schritt erfolgte die Beschichtung mit einer Substratlösung aus 10 mg 2,2'-Amino-bis (3 Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) (ABTS, Firma Sigma), die in 25 ml Citratpuffer gelöst wurden. Zu den 12 ml ABTS Lösung wurden 300 µl 1:100 vorverdünntes 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben und 100 µl Substratlösung pro Kavität aufgetragen. Die Messung der Farbreaktion erfolgte nach einer 10 bis 15 minütigen Inkubation bei Zimmertemperatur in Abhängigkeit von der Reaktion der Positivkontrolle bei einer Wellenlänge von 405 nm mit dem Photometer.

### 3.1.3.2 Festlegung des „Cut-Off“

Da der beschriebene Test ursprünglich zur Diagnostik der *Sarcoptes*-Räude des Hundes entwickelt worden war, mußte zunächst geprüft werden, in wie weit er sich auch für den Fuchs eignet. Dazu standen insgesamt 110 Seren von klinisch gesunden Silberfüchsen (*Vulpes vulpes foina*) aus dem Bundesinstitut für gesundheitlichem Verbraucherschutz und Veterinärwesen (BgVV) (n=44), sowie Seren von Fuchsbeständen des Serumwerkes aus Dessau (n=66) zur Verfügung. Diese Seren wurden durch Punktion der Vena Saphena gewonnen.

Als Positivseren dienten die Proben, die von Rotfüchsen (n =198) mit klinischer Räude aus dem Stadtgebiet von Berlin im Zeitraum 1996 – 1999 entnommen wurden.

Da es sich hierbei um Material, daß von zum Teil bereits mehreren Tagen toten Füchsen (Herzblut, Blut aus den großen Körpergefäßen oder im Falle einer Verletzung um Thorax- oder Abdominalflüssigkeit) handelte, war die Serumqualität überwiegend stark hämolytisch.

Die Mittelwerte der Extinktionen der negativen und positiven Seren beliefen sich auf 0,307 bzw. 1,571. Individuell traten traten Schwankungen bei beiden Serumgruppen von 0,135 bis 0,492, bzw.0,104 bis 2,752 auf (Abbildung: 6, 7).

Anhand dieser Negativ- und Positivseren wurde mittels des TG – ROC (two – graph receiver operating characteristic) (GREINER et al. 1995) der Cut-Off unter Berücksichtigung der Spezifität und Sensivität bestimmt und auf 0,464 festgelegt (Abb.5).

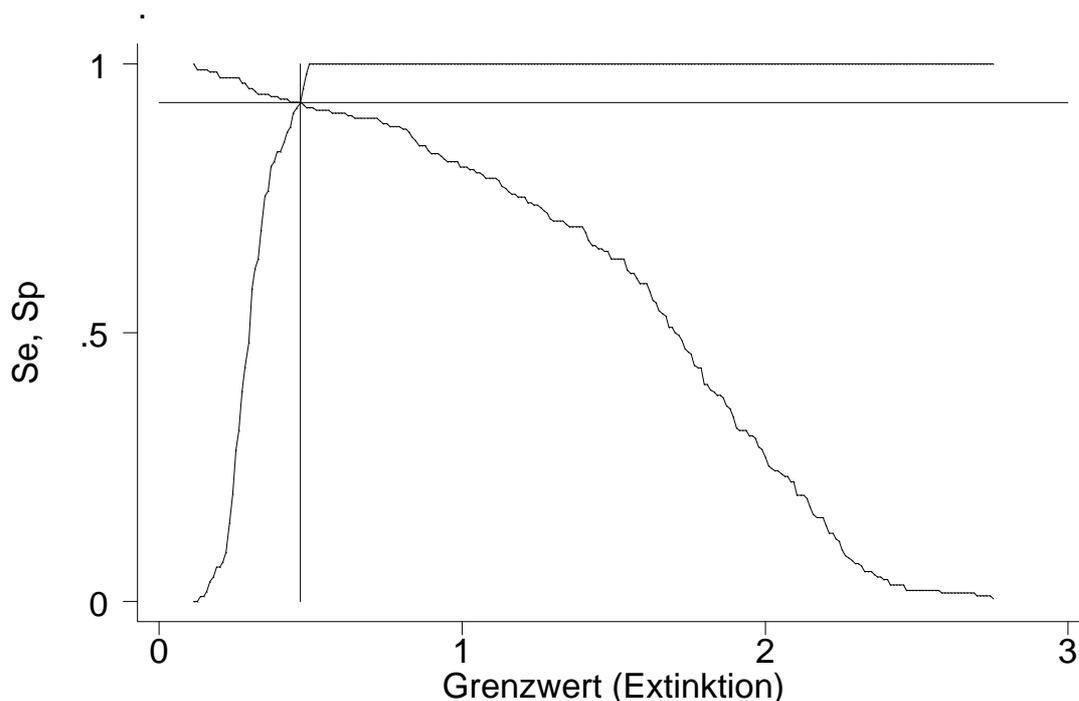


Abbildung 5: Festlegung des Cut-Off

Ergebnisse      Grenzwert  $d_0$     = 0,464  
                      Theta0            = 0,928

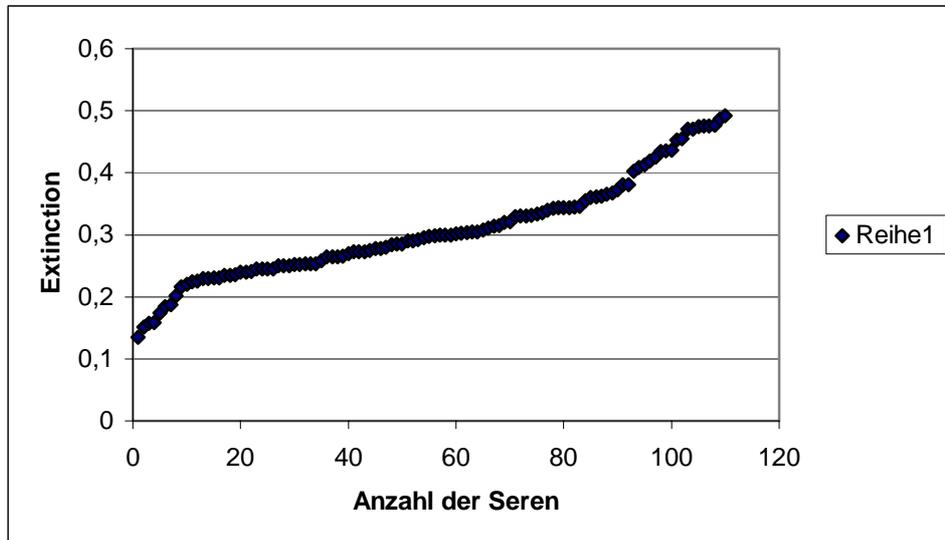


Abbildung 6: Extinktionswerte der rüdenegativen Fuchsseren (n=110) im ELISA bei 405 nm

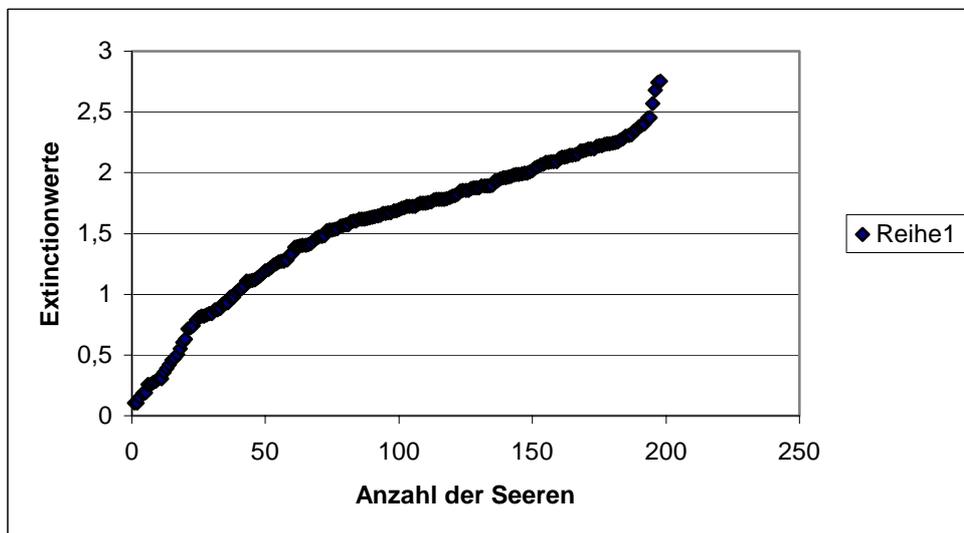


Abbildung 7: Extinktionswerte der rüdepositiven Fuchsseren (n= 198) im ELISA bei 405 nm

### 3.1.3.3 Statistische Bearbeitung der Daten

Zur Datenauswertung bestand die Notwendigkeit, die zu den Seren gehörenden, im Rahmen der Sektion erhobenen Befunde, als Datensätze in Form von Excel-Tabellen aufzulisten (Anhang Tabelle XIV). Bei den übernommenen Daten der 1025 Seren handelt es sich um folgende Kriterien: 1.: die fortlaufende Sektionsnummer, 2.: den Stadtbezirk Berlins, in dem das Tier erlegt, geschossen oder tot aufgefunden wurde, 3.: das Einsendedatum, 4.: die Todesursache (g: geschossen, t: tot aufgefunden, u: aufgrund eines Unfalls verendet), 5.: das Alter (j = juvenil, wobei die Füchse als Jungfüchse galten, die im laufenden Jahr gewölft worden waren. Die Altersbestimmung erfolgte anhand der Zahnabnutzung und am Vorhandensein von Thymusgewebe, a = adult), 6.: das Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), 7.: das klinische Erscheinungsbild (0: klinisch inapparent, 1: klinisch apparent), 8.: der ermittelte Extinktionswert, 9.: Beurteilung des untersuchten Serums: 0 = negativ, 1 = positiv.

Es wurden letztlich nur die Tiere berücksichtigt, von denen Serum vorlag.

Die statistische Bearbeitung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm Epi-Info im Softwarepaket Epi-Info 6 (DEAN et al. 1996). Beim Vergleich von Prozentsätzen waren die Unterschiede signifikant, wenn sich die ermittelten Konfidenzintervalle ( $p < 0,05$ ) nicht überlappten.