

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Probenentnahme

Von 100 Rotfüchsen waren 78 Tiere mit Schildzecken und 41 mit Flöhen befallen. Bei 15 Füchsen konnte weder ein Zecken- noch ein Flohbefall festgestellt werden. Beim überwiegenden Teil der Füchse wurden bis zu 10 Zecken abgesammelt (Tab. 9). Eine jahreszeitliche Abhängigkeit des Ektoparasitenbefalls konnte nicht festgestellt werden.

Tab. 9: Anzahl abgesammelter Zecken pro Fuchs

Zecken	1-5	6-10	11-15	16-20	> 20
Füchse	40	19	10	4	5

Unter den insgesamt 593 *Ixodes*-Zecken waren 142 Nymphen und 451 Adulte. Die Bestimmung der Zecken ergab eine Befallsintensität mit *I. ricinus* von 92,6 %, mit *I. hexagonus* von 6,6 % und mit *I. canisuga* von 0,8 %. Eine Zuordnung zu den einzelnen Spezies erfolgte nur bei den Nymphen und den geschlechtsreifen Weibchen und Männchen. Die Flöhe wurden nicht in Spezies unterteilt.

Der positive Tetrazyklinnachweis in den Kieferknochen in 72% der untersuchten Tiere bewies die hohe Aufnahmerate von ausgelegten Tollwutködern. Die Ergebnisse der Probenentnahme sind in der Tab. 10 (siehe Anhang) zusammengefasst.

3.2.2. Bakteriologische Untersuchungen zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.

Die kulturelle Anzucht zum Nachweis von Borrelien in Hautproben von Rotfüchsen gelang nicht.

In den Kulturröhrchen von 26 Füchsen (Tab. 10, siehe Anhang) konnten aber unbewegliche, spirochätenähnliche „Organismen“ im Dunkelfeldmikroskop

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

(Fa. Zeiss) bei 160-400facher Vergrößerung festgestellt werden (Abb. 5). Nach ca. 1 Woche wurden diese in der Subkultur wieder nachgewiesen.

In der Tab. 3 ist die Zuordnung der Füchse zu den beiden Medien mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen zu erkennen.

Tab. 3: Wachstum der spirochätenähnlichen Gebilde in Abhängigkeit vom Medium und von Antibiotikazusätzen

Fuchs	BSK II-Medium	MKP-Medium
7		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
16	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
19	+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)	
21		+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
31	+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)	
36		+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
46		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
49	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
51		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
52		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
55		+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
59	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
62	+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)	
63	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin) + (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)	
74		+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
77	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
78	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
79	+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)	
80	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
81		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)
82	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
83	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
84	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	+ (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
89	+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)	
97		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin) + (Rifampicin+5-Fluorouracil+Amphotericin B)
98		+ (5-Fluorouracil+Kanamycin)

BSK II-Medium: 11 mal + (5-Fluorouracil + Kanamycin)
5 mal + (Rifampicin + 5-Fluorouracil + Amphotericin B)

MKP-Medium: 8 mal + (5-Fluorouracil + Kanamycin)
6 mal + (Rifampicin + 5-Fluorouracil + Amphotericin B)

Diese spirochätenähnlichen Gebilde wuchsen bei 15 Tieren im BSK II-Medium, bei 13 Tieren im MKP-Medium und bei 2 Tieren in beiden Medien. Beim Fuchs 63 waren sie im BSK II-Medium und beim Fuchs 97 im MKP-Medium sowohl in der Hemmstoffkombination (5-Fluorouracil + Kanamycin) als auch (Rifampicin + 5-Fluorouracil + Amphotericin B) sichtbar.

Nach erfolgreicher Anzüchtung auf Tryptose-Agar waren zwei Koloniefornen bei Henry'scher Beleuchtung sichtbar. Zum einen waren es starktexturierte, bazillenähnliche Kolonien und zum anderen feintexturierte Kolonien, die denen der Corynebakterien ähnelten. Nach Verbringen in Kulturmedium konnten nach einigen Tagen die unbeweglichen, spiralförmigen Gebilde reproduziert werden. Diese wurden dann in der PCR analysiert und gaben keine Hinweise für das Vorliegen von Borrelien. Elektronenmikroskopisch waren unspezifische Flagellenbündel zu erkennen (Abb. 6).

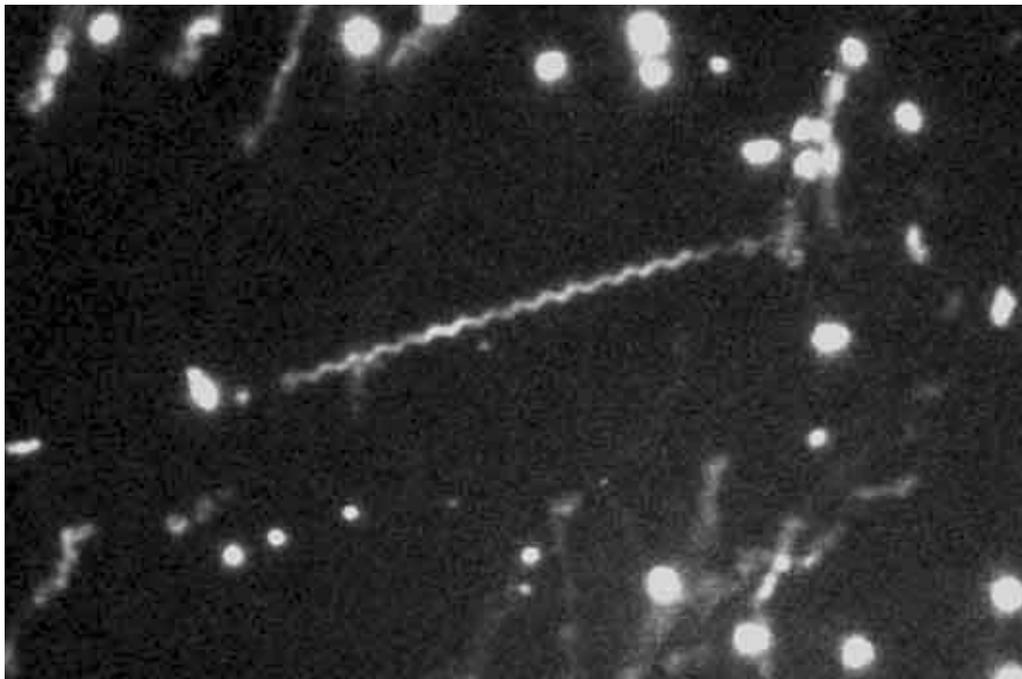


Abb. 5: unbewegliche, spirochätenähnliche Gebilde im Dunkelfeldmikroskop (Originalvergrößerung 1:400)



Abb. 6: elektronenmikroskopische Aufnahme der spirochätenähnlichen Gebilde

3.2.3. Serologische Untersuchungen zum Antikörper-Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Anti-*Borrelia*-IgG konnte im Blutserum der immunisierten Füchse (Vorversuch) nachgewiesen werden. Die Ratio lag im Bereich von 1,32 bis 1,44.

Die Vollblutseren aller untersuchten Rotfüchse waren sowohl im Viramed®-Testkit als auch im laboreigenen ELISA-Test seronegativ.

3.2.4. Untersuchungen zum Antigen-Nachweis in den Zecken mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT)

3.2.4.1. Einsatz polyklonaler Antikörper

Mit dem Hyperimmunserum gegen *B. garinii*, Stamm 1 B 29, reagierten von 100 Zeckenproben 45 positiv (Tab. 11, 13).

3.2.4.2. Einsatz monoklonaler Antikörper

Mit den monoklonalen AK gegen OspA reagierten von 100 Zeckenproben 18 positiv (Tab. 11, 13).

Kontrollzecken:

Alle 17 negativen Kontrollzecken reagierten sowohl mit den polyklonalen AK als auch mit den monoklonalen AK negativ. Von den 4 positiven Kontrollen reagierten 2 Zecken mit beiden AK positiv.

3.2.5. Spezifischer *B. burgdorferi* s.l. DNS-Nachweis in den Zecken und Hautproben mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.2.5.1. Analytische Spezifität und Sensitivität der PCR

Alle 15 getesteten Stämme der Spezies *B. burgdorferi* s.l. zeigten die erwarteten Amplifikationsprodukte von 259 bp (JS 1/2; Abb. 7), 308 bp (SL 1/2) und 662 bp (nested-PCR: außen) bzw. 392 bp (nested-PCR: innen). Die 17 mituntersuchten Kontrollzecken reagierten regelmäßig negativ (Spezifität 100 %).

Zur Überprüfung der Sensitivität wurden Zeckengemische bzw. Hautproben vom Rotfuchs mit vier unterschiedlichen Borrelienkonzentrationen (100 fg; 10 fg; 1 fg; 0,1 fg *B. burgdorferi* s.l.-DNS) versetzt (Abb. 8). Die beiden PCR aus dem Vorversuch konnten bis zu 10 fg Borrelien-DNS (10 Borrelien) nachweisen. Die nested-PCR erwies sich dagegen mit einer Nachweisgrenze von 1 fg Borrelien-DNS (< 1 Borrelie) am empfindlichsten. Die nachfolgenden Untersuchungsergebnisse beziehen sich daher auf die nested-PCR.

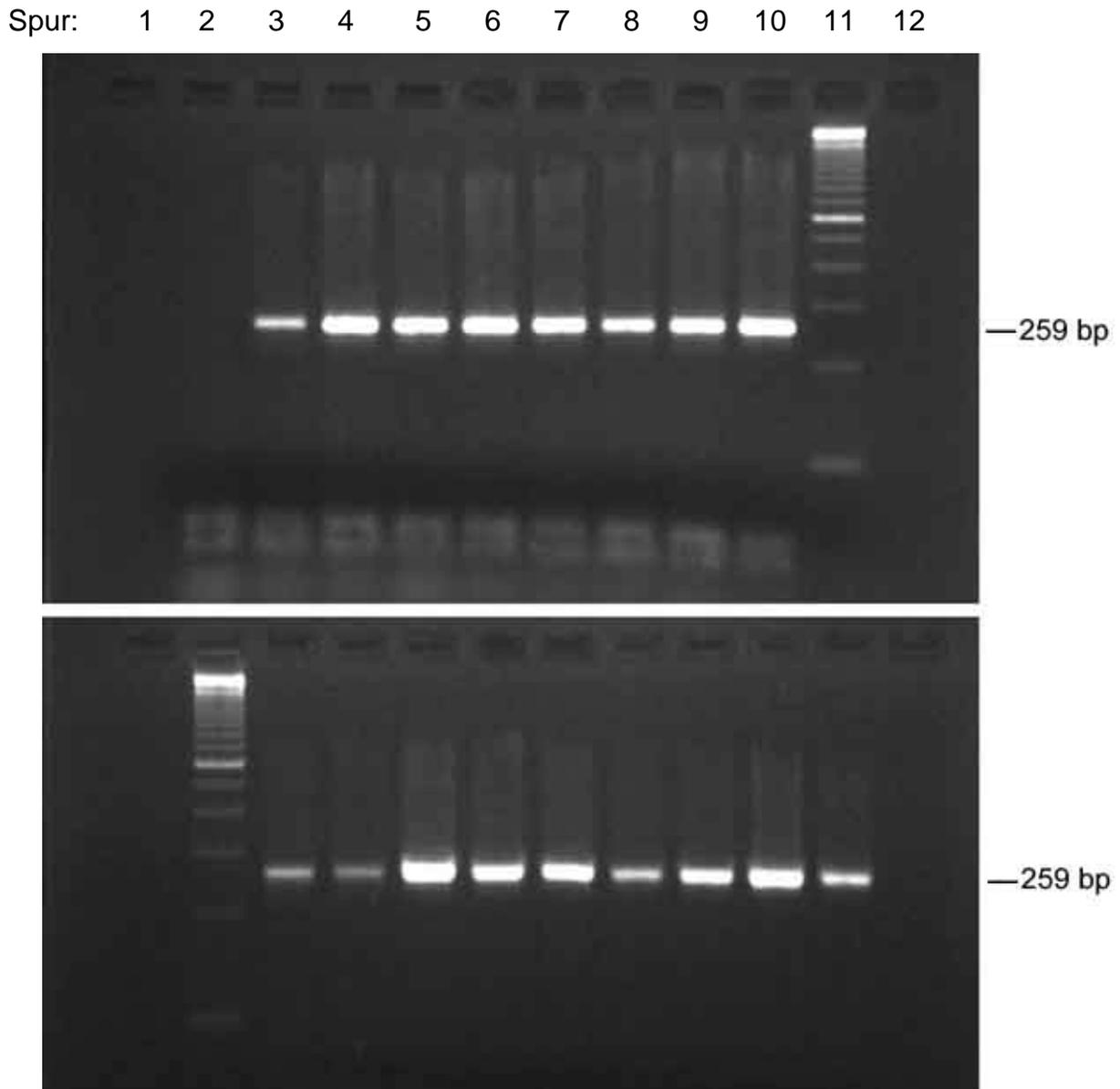


Abb. 7: Amplifikationsprodukte verschiedener Stämme von *B. burgdorferi* s.l.

oben →	Spur 1:	leer	unten →	Spur 1:	leer
	Spur 2:	Negativkontrolle (Wasser)		Spur 2:	100 bp DNS-Längenstandard
	Spur 3:	Positivkontrolle		Spur 3:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)
	Spur 4:	<i>B. garinii</i> (1 B 29)		Spur 4:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)
	Spur 5:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (93 B 22)		Spur 5:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)
	Spur 6:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)		Spur 6:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B 31)
	Spur 7:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (B 31)		Spur 7:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (93 B 22)
	Spur 8:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (93 B 22)		Spur 8:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)
	Spur 9:	<i>B. afzelii</i> (97 B 3)		Spur 9:	<i>B. garinii</i> (1 B 29)
	Spur 10:	<i>B. garinii</i> (1 B 29)		Spur 10:	<i>B. burgdorferi</i> s.s. (93 B 22)
	Spur 11:	100 bp DNS-Längenstandard		Spur 11:	Positivkontrolle
	Spur 12:	leer		Spur 12:	Negativkontrolle (Wasser)

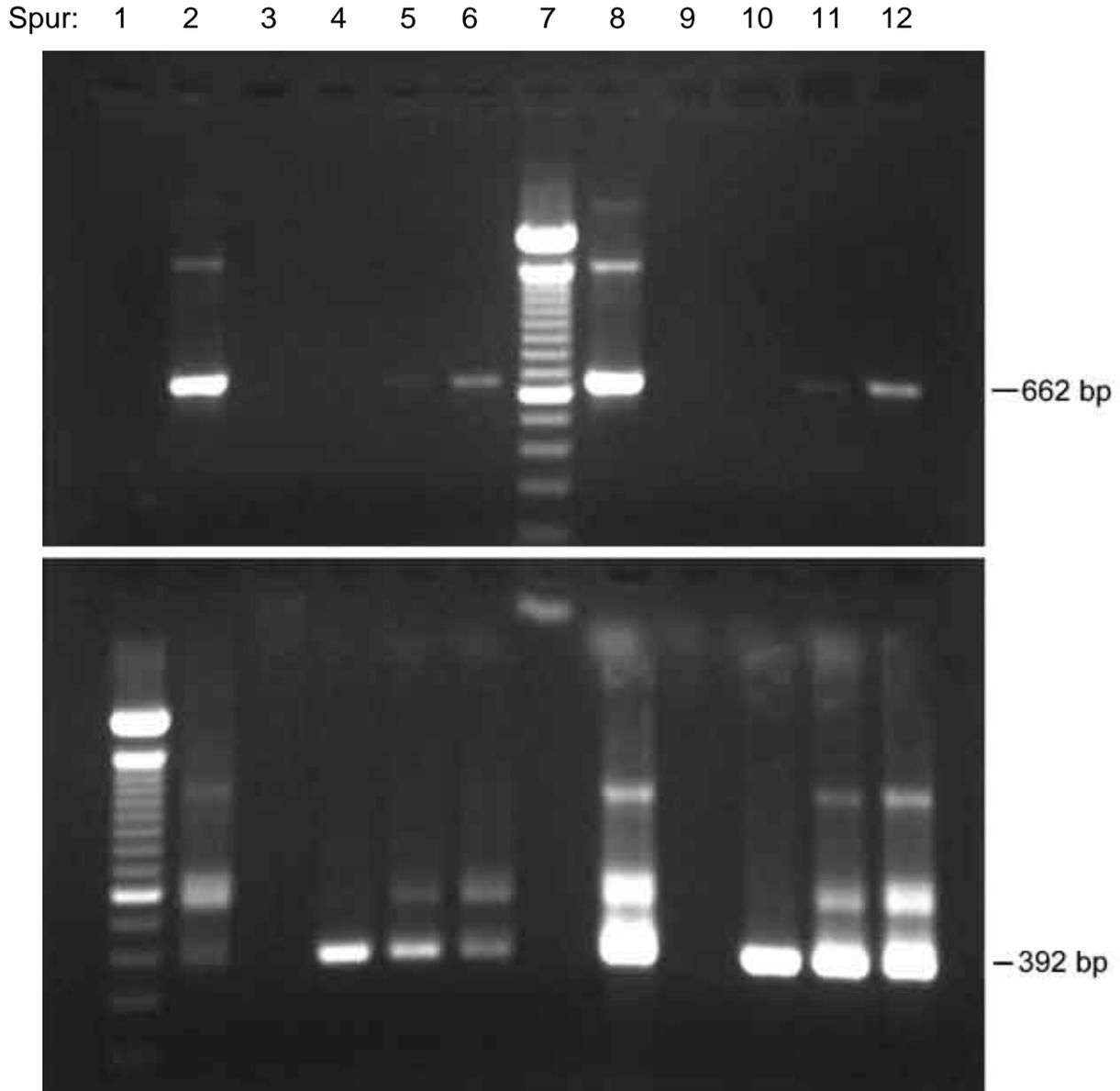


Abb. 8: Bestimmung der Nachweisgrenze in der nested-PCR

	Primersatz: außen		Primersatz: innen
oben →	Spur 1: Negativkontrolle (Wasser)	unten →	Spur 1: 100 bp DNS-Längenstandard
	Spur 2: Positivkontrolle		Spur 2: Positivkontrolle
	Spur 3: 0,1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 3: 0,1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 4: 1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 4: 1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 5: 10 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 5: 10 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 6: 100 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 6: 100 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 7: 100 bp DNS-Längenstandard		Spur 7: Negativkontrolle (Wasser)
	Spur 8: Positivkontrolle (<i>B. burgdorferi</i>)		Spur 8: Positivkontrolle
	Spur 9: 0,1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 9: 0,1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 10: 1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 10: 1 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 11: 10 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 11: 10 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS
	Spur 12: 100 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS		Spur 12: 100 fg <i>B. burgdorferi</i> s.l.-DNS

3.2.5.2. Untersuchungsergebnisse der PCR

In der nested-PCR waren 19 % der Zecken (Abb. 9) und 7 % der Hautproben (Abb. 11) positiv (Tab. 11, 12, 13).

Die PCR-Produkte der Zeckenuntersuchung wurden im Southern-Blot-Verfahren bestätigt (Abb. 11).

Zusammenfassend sind in der Tab. 13 die positiven Ergebnisse der Zeckenuntersuchung mittels IIFT und PCR gegenübergestellt.

Tab. 13: Gegenüberstellung der IIFT- und PCR-Ergebnisse der 100 Zecken von 31 Rotfüchsen

pos. Ergebnisse	IIFT/polyklonale AK	IIFT/monoklonale AK	PCR
IIFT/polyklonale AK	45	18	17
IIFT/monoklonale AK	18	18	6
PCR	17	6	19