

Aus dem Institut für Parasitologie und internationale Tiergesundheit
des Fachbereiches Veterinärmedizin
-Freie Universität Berlin-

und dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz
und Veterinärmedizin (BgVV)

**Untersuchungen zur Prävalenz von *Borrelia burgdorferi sensu lato*
beim Rotfuchs (*Vulpes vulpes*) in Ostbrandenburg**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jana Heidrich
Tierärztin aus Frankfurt (Oder)

Berlin 2000
Journal-Nr. 2439

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Amtierender Dekan: Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. E. Schein

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler

Tag der Promotion: 22.12.2000

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG.....	1
2.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1.	Erreger.....	3
2.1.1.	Taxonomie.....	3
2.1.2.	Morphologie.....	4
2.1.3.	Antigenstruktur.....	5
2.2.	Epidemiologie.....	6
2.2.1.	Vektoren und Übertragung.....	7
2.2.2.	Erregerreservoir.....	9
2.3.	Klinik.....	11
2.3.1.	Humanmedizinische Aspekte.....	11
2.3.2.	Veterinärmedizinische Aspekte.....	13
2.3.2.1.	Hund und Katze.....	13
2.3.2.2.	Wiederkäuer.....	14
2.3.2.3.	Pferd.....	15
2.4.	Immunantwort.....	16
2.5.	Diagnostik.....	16
2.5.1.	Direkter Erregernachweis.....	17
2.5.1.1.	Mikroskopie.....	17
2.5.1.2.	Kultivierung.....	17
2.5.1.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.5.2.	Indirekter Erregernachweis.....	19
2.5.2.1.	Immunfluoreszenztest (IFT).....	19
2.5.2.2.	Indirekter Hämagglutinationstest (IHAT).....	20
2.5.2.3.	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	21
2.5.2.4.	Immuno-Blot (Western-Blot).....	21

3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	22
3.1.	Material und Methoden.....	22
3.1.1.	Probenmaterial.....	22
3.1.1.1.	Herkunft, Alter und Geschlecht der Füchse.....	22
3.1.1.2.	Probenentnahme.....	22
3.1.1.3.	Aufbewahrung der Proben.....	23
3.1.2.	Bakteriologische Untersuchungen zum Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s.l.	24
3.1.2.1.	Kultivierung.....	24
3.1.2.1.1.	Präparation der Hautproben.....	24
3.1.2.1.2.	Nährmedien und Hemmstoffe.....	24
3.1.2.1.3.	Subkultivierung.....	25
3.1.2.2.	Dunkelfeldmikroskopie.....	25
3.1.3.	Serologische Untersuchungen zum AK-Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	26
3.1.3.1.	Einsatz des Viramed®-Testkits.....	26
3.1.3.2.	Einsatz des laboreigenen ELISA-Testkits.....	26
3.1.4.	Untersuchungen zum Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Zecken mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT).....	27
3.1.4.1.	Präparation der Zecken.....	27
3.1.4.2.	Objektträgerbeschichtung.....	27
3.1.4.2.1.	Einsatz polyklonaler Antikörper.....	28
3.1.4.2.2.	Einsatz monoklonaler Antikörper.....	28
3.1.4.2.3.	Konjugat.....	28
3.1.4.3.	Fluoreszenzmikroskopie.....	28
3.1.4.4.	Beurteilungskriterien.....	29
3.1.5.	Spezifischer <i>B. burgdorferi</i> s.l. DNS-Nachweis in den Zecken und Hautproben mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30
3.1.5.1.	Präparation der Zecken und Hautproben.....	30
3.1.5.2.	Isolierung der DNS mit Hilfe des QIAamp® Tissue Kits.....	30
3.1.5.3.	Durchführung der PCR.....	30
3.1.5.4.	Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.1.5.5.	Southern-Blot-Verfahren.....	34

3.2.	Ergebnisse.....	37
3.2.1.	Probenentnahme.....	37
3.2.2.	Bakteriologische Untersuchungen zum Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s.l.....	37
3.2.3.	Serologische Untersuchungen zum AK-Nachweis mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	40
3.2.4.	Untersuchungen zum Nachweis von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Zecken mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IIFT).....	40
3.2.4.1.	Einsatz polyklonaler Antikörper.....	40
3.2.4.2.	Einsatz monoklonaler Antikörper.....	41
3.2.5.	Spezifischer <i>B. burgdorferi</i> s.l. DNS-Nachweis in den Zecken und Hautproben mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
3.2.5.1.	Analytische Spezifität und Sensitivität der PCR.....	41
3.2.5.2.	Untersuchungsergebnisse der PCR.....	44
4.	DISKUSSION.....	48
4.1.	Untersuchung der Hautproben auf <i>B. burgdorferi</i> mittels Kultivierung und PCR.....	49
4.2.	Serologische Untersuchungen zum AK-Nachweis mittels ELISA.....	53
4.3.	Untersuchung der Zecken auf <i>B. burgdorferi</i> mittels indirektem IFT und PCR.....	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6.	SUMMARY.....	60
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	61
8.	ANHANG.....	95
9.	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
AG	Antigen
AK	Antikörper
ATTC	American Type Culture Collection
AV	atrioventrikulär
B.	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaare
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
C	Cytosin
DIFT	direkter Immunfluoreszenztest
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemilumineszenz
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	Erythema migrans
EUCALB	European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis
Fa.	Firma
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanosin
Hrsg.	Herausgeber
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
IIFT	indirekter Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IHAT	indirekter Hämagglutinationstest
KGW	Körpergewicht
kDa	Kilodalton
MKP	modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic
Osp	outer surface protein (Oberflächenprotein)

PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalz- lösung)
PBS/MgCl ₂	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit MgCl ₂
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	Wasserstoffionenkonzentration
p.i.	post infectionem
SLO	spirochaete-like objects (spirochätenähnliche Gebilde)
s.l.	sensu lato
sp.	Spezies
s.s.	sensu stricto
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen

9. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

TABELLEN

- Tab. 1: Prävalenzraten von *B. burgdorferi* in *I. ricinus* in Europa (ermittelt mittels IFT und PCR)
- Tab. 2: Herkunft, Alter und Geschlecht der Rotfüchse
- Tab. 3: Wachstum der spirochätenähnlichen Gebilde in Abhängigkeit vom Medium und von Antibiotikazusätzen
- Tab. 4: Überblick über die PCR-Primersätze
- Tab. 5: Zyklusparameter der 23 rRNA-Gen-PCR
- Tab. 6: Zyklusparameter der OspA-Gen-PCR
- Tab. 7: Pipettierschema der nested-PCR
- Tab. 8: Zyklusparameter der nested-PCR
- Tab. 9: Anzahl abgesammelter Zecken pro Fuchs
- Tab. 10: Ergebnisse der Probenentnahme
- Tab. 11: Untersuchungsergebnisse (IIFT, PCR) der 100 Zecken von 31 Rotfüchsen zum Vorkommen von *B. burgdorferi*
- Tab. 12: Untersuchungsergebnisse der Hautproben von 100 Rotfüchsen zum Vorkommen von *B. burgdorferi*
- Tab. 13: Gegenüberstellung der IIFT- und PCR-Ergebnisse der 100 Zecken von 31 Rotfüchsen

ABBILDUNGEN

- Abb. 1: Schematischer Aufbau einer Borrelie im Querschnitt (nach KRAICZY et al., 1998)
- Abb. 2: elektronenmikroskopische Darstellung längs- und quergeschnittener *B. burgdorferi* (Originalvergrößerung links 1: 18000, rechts 1: 10500)
- Abb. 3: Überblick über die Landkreise Brandenburgs
- Abb. 4: Querschnitt des Aufbaus zum Southern-Blot
- Abb. 5: unbewegliche, spirochätenähnliche Gebilde im Dunkelfeldmikroskop (Originalvergrößerung 1:400)
- Abb. 6: elektronenmikroskopische Aufnahme der spirochätenähnlichen Gebilde
- Abb. 7: Amplifikationsprodukte verschiedener Stämme von *B. burgdorferi*
- Abb. 8: Bestimmung der Nachweisgrenze in der nested-PCR
- Abb. 9: Amplifikationsprodukte der Zeckenuntersuchung in der nested-PCR
- Abb. 10: Southern-Blot-Hybridisierung der Amplifikationsprodukte der Zeckenuntersuchung in der nested-PCR
- Abb. 11: Amplifikationsprodukte der Hautproben in der nested-PCR

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. E. Schein für die Überlassung des Themas und der wissenschaftlichen Betreuung der Arbeit,

Herrn Dr. D. Protz für die Ermöglichung der Untersuchungen im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin in Berlin-Marienfelde,

den Herren Dr. K. Nöckler, Dr. S. Steuber, Dr. A. Schönberg, Dr. Ch. Staak und Dr. W.-P. Voigt für die freundliche und fachliche Unterstützung bei den Untersuchungen, den vielen wertvollen Anregungen sowie der jederzeit gewährten Hilfsbereitschaft,

Frau I. Schirrmann für die Hilfe bei der Einarbeitung in die PCR-Technik,

Herrn Dr. P. Schulze für die Durchführung und Auswertung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen,

Herrn Dr. M. Greiner vom Institut für Parasitologie und internationale Tiergesundheit der FU für die Hilfe bei der Durchführung der serologischen Untersuchung,

Herrn Dr. H.-J. Kubsch und meinem Vater, Herrn Dr. R. Heidrich, für die Organisation der Probenentnahme und -aufbereitung im Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Frankfurt (Oder)

und nicht zuletzt meinen Eltern für die Unterstützung und das Verständnis bei der Durchführung der Dissertation.

LEBENS LAUF

Name: Jana Heidrich
Geburtstag: 12.11.1970
Geburtsort: Frankfurt (Oder)
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Schulbildung:
09.1977 bis 07.1987 Polytechnische Oberschule, Frankfurt (Oder)
Berufsausbildung:
09.1987 bis 07.1990 Ausbildung zum Facharbeiter für Tierproduktion mit
Abitur, VEB Schweinezucht und -mast Eberswalde
Hochschulausbildung:
09.1990 bis 02.1996 Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
(Standort Mitte)
Approbation: 15.03.1996
Dissertation: 04.1996 Beginn der Doktorarbeit
Berufliche Tätigkeit:
07.1996 bis 04.1999 angestellte Tierärztin in der Tierarztpraxis
DVM T. Prejawa, Frankfurt (Oder)
seit 05.1999 wissenschaftliche Angestellte im BgVV Berlin-
Marienfelde

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet.

Die Arbeit wurde bisher in keinem anderen Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.