

3. Material und Methoden

In der Klinik für Pferdekrankheiten, Allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin wurden über einen Zeitraum von 10 Monaten 337 Patienten klinisch und labordiagnostisch auf Lyme-Borreliose (LB) untersucht. Dabei konnten zwei Gruppen gebildet werden: der Gruppe A zugeordnet waren die Probanden ohne auffällige Symptomatik im Sinne einer LB (n=195), Gruppe B hingegen beinhaltete die Probanden mit LB-ähnlichen Symptomen (n=142). Von allen Pferden wurde eine Blutprobe gezogen und auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l. getestet sowie ein Differentialblutbild angefertigt. Zusätzlich konnte von den klinisch auffälligen Patienten (n=142) Probenmaterial wie Haut (n=16), Liquor (n=15), Synovia (n=26) und Vollblut (n=19) gewonnen und direkten Nachweisverfahren unterzogen werden.

Die labordiagnostischen Untersuchungen wurden im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin)* durchgeführt.

Unterstützung erhielt diese Arbeit von Herrn Dr. S. Brem vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL, Oberschleißheim) und von Herrn Dr. W. Müller vom Analytischen Labor (ALOMED, Radolfzell-Böhringen).

3.1. Klinische Untersuchung

3.1.1. Anamnese und klinische Untersuchung

Beide Versuchsgruppen wurden einer klinischen Untersuchung unterzogen, wobei der Allgemeinzustand, der Ernährungszustand sowie die rektal gemessene Körpertemperatur in die Auswertung einfließen. Die Anamnese jedes einzelnen Tieres umfasste die Registrierung von Name, Alter, Geschlecht, Rasse, Haltungsform sowie Nutzungsrichtung und Beobachtung von Zeckenbefall seitens des Besitzers. Die Diagnose erbrachte die spezielle Untersuchung, die im Rahmen des Klinikbetriebes durchgeführt wurde. Zusätzlich erfolgte von jedem Tier die Anfertigung eines Differentialblutbildes, das u.a. die absolute Leukozytenzahl und den prozentualen Anteil von stabkernigen sowie segmentkernigen neutrophilen Granulozyten beinhaltete.

* seit dem 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Die Proben wurden im Zeitraum vom 01.10.2000 bis 31.07.2001 gezogen. Alle 337 Pferde stammten aus der Region Berlin/Brandenburg. Das Geschlecht verteilte sich auf 203 männliche (davon 156 kastriert) und 134 weibliche Tiere.

Das Alter der Probanden lag zwischen 5 Tagen und 36 Jahren. Bei den Rassen handelte es sich vorwiegend um Vollblut/Traber (n=62), Warmblut (n=182), Kleinpferd (n=30), unterschiedliche Ponyrassen (n=19) und andere (n=44).

3.1.2. Untersuchungsmaterial

3.1.2.1. Blut

Die Punktion erfolgte am Übergang vom oberen zum mittleren Drittel der linken Vena (V.) jugularis mit Hilfe einer Kanüle (1,2 x 40 mm, Fa. Braun). Das Blut wurde in jeweils ein 4 ml mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) beschichteten Röhrchen (Fa. Sarstedt) und ein 10 ml Serumröhrchen (Fa. Sarstedt) verbracht. Das EDTA-Blut (Vollblut) diente zum einen zur Bestimmung des Differentialblutbildes und zum anderen zum direkten Erregernachweis. Dazu wurden zwei 1,8 ml fassende Eppendorfröhrchen (Fa. Roth) mit dem Vollblut befüllt und bei $-21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ bis zur Antigenbestimmung mit Hilfe der PCR gelagert (s. Kap. 3.2.1.2.).

Das Serumröhrchen wurde nach 30 min bei 3600 g für 10 min zentrifugiert (CPK Centrifuge, Fa. Beckman) und das daraus gewonnene Serum in zwei 1,8 ml fassende Eppendorfröhrchen (Fa. Roth) abpipettiert. Die Lagerung des Serums erfolgte bis zur Bestimmung der AK gegen *B. burgdorferi* ebenfalls bei $-21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (s. Kap. 3.2.2.).

3.1.2.2. Haut

Die Hautbiopsie erfolgte mit Hilfe der Hautbiopsiestanze (\varnothing 8 mm, Fa. Eickemeyer) in der Mitte der linken Halsseite. Dazu wurde der Hautabschnitt geschoren und rasiert sowie mit 70%igem Alkohol (Hospisept®, Fa. Lysoform) und abschließend mit Braunoderm® (Fa. Braun) desinfiziert. Zur Schmerzausschaltung kam eine fächerförmige Lokalanästhesie mit 5 ml Scandicain 2%® (Fa. Astra Zeneca) zum Einsatz. Mit Hilfe der Hautstanze wurde ein 8 mm großes Stück Haut entnommen und die Wunde mit einer Hautklammer (Klammergerät, Fa. WDT) verschlossen. Das Probenmaterial wurde halbiert, wobei der eine Teil der kulturellen Anzucht (s. Kap. 3.2.1.1.) diente. Der andere Teil wurde in ein mit

physiologischer Kochsalzlösung gefülltes 1,8 ml Eppendorfgesäß verbracht. Die Lagerung der Hautprobe erfolgte bei $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ bis zur Antigenbestimmung mit Hilfe der PCR.

3.1.2.3. Liquor

Die Gewinnung von Liquor cerebrospinalis erfolgte am narkotisierten Tier in Seitenlage. Die Haut über der dorsalen Seite des Atlantookzipitalgelenks des Probanden wurde geschoren und mit 70%igem Alkohol (Hospisept®, Fa. Lysoform) und abschließend mit Braunoderm® (Fa. Braun) desinfiziert. Das palpatorisch gut auffindbare Spatium atlantooccipitale wurde mit einer Spinalnadel der Fa. Braun (1,1 x 88 mm, Spinocan®) mit Madrin in der Längsachse der Halswirbelsäule und parallel zum Boden punktiert und der austretende Liquor in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Der Liquor wurde zum einen der kulturellen Anzucht zugeführt und zum anderen in zwei 1,8 ml fassende Eppendorfröhrchen verbracht, die bis zur Untersuchung auf spezifische Borrelien-DNA mit Hilfe der PCR bei $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ gelagert wurden.

3.1.2.4. Synovia

Das synoviale Probenmaterial wurde aus dem jeweils erkrankten Gelenk punktiert, wobei sowohl Huf-, Fessel-, Karpal- und Kniegelenk betroffen waren. Die Punktion erfolgte an den entsprechenden anatomischen Lokalisationen. Nach vorangegangener Schur und Desinfektion (s.o.) wurde das betroffene Gelenk mit Hilfe einer Kanüle (1,2 x 40 mm, Fa. Braun) punktiert. Die Synovia diente zum einen der kulturellen Anzucht. Der andere Teil wurde in zwei 1,8 ml fassende Eppendorfröhrchen verbracht und bei $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ bis zur Untersuchung mit Hilfe der PCR gelagert.

3.2. Labordiagnostische Untersuchung

3.2.1. Direkter Erregernachweis

Für den direkten Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. dienen die kulturelle Anzucht und die Polymerase-Kettenreaktion.

3.2.1.1. Kulturelle Anzuchtung

Die Kultivierung der Untersuchungsmaterialien Haut (n=16), Liquor (n=15) und Synovia (n=26) erfolgte im modifizierten BSK-Medium (SCHÖNBERG et al., 1988) sowie im MKP-Medium (PREAC-MURSIC et al., 1992). Die im Zentralen Nährmedienbereich des BgVV hergestellten Medien wurden vor der Verwendung im Rahmen der Akkreditierung nach den in der Laborarbeitsanweisung „5-LA 169“ des BgVV enthaltenen Vorschriften erfolgreich geprüft. Die Medien wurden nach der Rezeptur im Anhang A frisch zubereitet, steril filtriert (Celluloseacetatmembranfilter, Fa. Sartorius), in 200 ml Schraubverschlussgefäße der Fa. Greiner verbracht und anschließend für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Sterilitätskontrolle umfasste dabei die evtl. auftretenden Farb- sowie Konsistenzveränderungen der Medien sowie die mikroskopische Untersuchung auf Mikroorganismen (Tab. 4).

Tab. 4 Beurteilung des bakteriellen Wachstums im Medium

Beurteilung	Makroskopisch	Dunkelfeldmikroskop
Kriterien	Verfärbungen (rosa → gelb) klar oder trüb Bodensatz	Wachstum (Keimzahl) Beweglichkeit Sterilität

Die im BgVV durchgeführten Vorversuche zeigten die Notwendigkeit der Antibiotikazugabe zum Medium. Deshalb kamen in diesem Versuchsaufbau drei Ansätze zum Einsatz, die sich in der Zusammensetzung des Mediums wie folgt unterschieden:

1. Röhrrchen: BSK- oder MKP-Medium nativ
2. Röhrrchen: BSK- oder MKP-Medium mit Hemmstoff-Kombination 1 (Rifampicin, Fluorouracil-GRY und Amphotericin B)
3. Röhrrchen: BSK- oder MKP-Medium mit Hemmstoff-Kombination 2 (Rifampicin, Polymycin B, Bactrim und Amphotericin B).

Die Rezeptur der einzelnen Hemmstoffe ist im Anhang A vermerkt.

Nach erfolgreicher Sterilitätskontrolle wurden die Nährmedien à 6 ml in 8 ml Kulturröhrrchen der Fa. Falcon steril abgefüllt (75% Füllung entspricht einem mikroaerophilen Milieu). Die Probenmenge betrug bei Flüssigkeiten (Liquor und Synovia) 0,3 ml pro Probenansatz. Bei den Hautproben wurde ein erbsengroßes Stück pro Ansatz verwendet. Beim Beimpfen der Kulturröhrrchen mit den verschiedenen Untersuchungsmaterialien wurde gleichzeitig auch ein Kontrollstamm in jeweils 1 Röhrrchen BSK- sowie MKP-Medium überimpft. Als Kontrollstamm

diente *B. garinii*, Stamm 1B29, ein Isolat aus dem Lyme-Borreliose-Labor des BgVV (SCHÖNBERG et al., 1988). In jedes Kontroll-Kulturröhrchen wurden ca. 10^5 Keime verbracht, d.h. 1 Röhrchen enthielt etwa 2×10^4 /ml Borrelien zu Beginn der Inkubation.

Nach 24 h erfolgte eine Subkultivierung der Hemmstoff 2-Röhrchen. Dabei wurde jeweils 0,1 ml Kulturmedium von Hemmstoff 2-Röhrchen in ein Nativ-Röhrchen und ein Hemmstoff 1-Röhrchen übertragen. Alle Proben wurden 3 Monate bei 33°C kultiviert und 1x wöchentlich auf Borrelien mit Hilfe des Dunkelfeldmikroskopes (DFM) der Fa. Zeiss bei 200facher Vergrößerung untersucht. In die Untersuchung flossen auch die makroskopisch sichtbaren Farb- sowie Konsistenzveränderungen des Mediums ein (Tab. 4). Vor allem der Farbumschlag von rosa zu gelb war von großem Interesse, da diese Reaktion eine Vermehrung der unerwünschten Begleitflora anzeigte.

3.2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion

Zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.-DNA wurde eine OspA-spezifische nested-PCR verwendet. Das Probenmaterial umfasste Haut (n=16), Liquor (n=15), Synovia (n=26) und Vollblut (n=19). Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurde das nach dem ersten PCR-Durchlauf positiv getestete Probenmaterial wiederholt untersucht.

Die Durchführung der nested-PCR erfolgte laut Angaben von HEIDRICH (2000).

DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen QIAamp® Tissue Kit der Firma Qiagen GmbH. Zunächst wurden die Proben bei Kühlschranktemperatur aufgetaut, anschließend mit Proteinase K versetzt, homogenisiert (Vortex) und bis zur vollständigen Auflösung bei 55°C inkubiert. Nach Zugabe von Puffer AL erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 10 min. Anschließend wurde der Ansatz mit 96%igem Alkohol versetzt, intensiv geschüttelt, in ein neues Röhrchen überführt und zentrifugiert (6000 g, 1 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zentrifugate mit Waschpuffer AW gereinigt und nochmals zweimal zentrifugiert (6000 g, 1 min). Die abschließende Zentrifugation erfolgte bei maximaler Umdrehung (16000 g, 2 min). Die entstandenen Eluate wurden in Eppendorfgefäße überführt und nach Zugabe von 10 mM Tris-HCL (pH 9,0) bei 70°C für 5 min inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren (6000 g, 1 min) konnte die DNA vollständig herausgelöst werden. Für die direkte DNA-Bestimmung mit Hilfe der PCR wurden jeweils 10 µl des Eluats verwendet.

Durchführung der nested-PCR

Die DNA-Replikation wurde mit Hilfe der nested-PCR, die die höchste Sensitivität bei Vorversuchen im BgVV zeigte, durchgeführt. Die Spezifität konnte an 15 *B. burgdorferi* s.l.-Stämmen aus dem BgVV ermittelt werden.

Die nested-PCR zeichnet sich durch zwei aufeinanderfolgende Durchläufe mit unterschiedlichen Ansätzen aus, wobei dem äußeren Ansatz ein innerer Ansatz folgt.

Für den äußeren Ansatz kamen die Primerpaare prZS 7/31-1 und OspA-5 zum Einsatz. Der innere Ansatz erfolgte mit den Primerpaaren OspA-6 und OspA-8. Eine Übersicht über die Primersätze gibt Tabelle 5. Die Positiv- sowie Negativkontrolle wurden bei den Ansätzen mitgeführt.

Tab. 5 Überblick über die PCR-Primersätze

Primer	Zielsequenz (5' → 3')	Position	Länge
prZS 7/31-1	GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC C	18 → 39	662 bp
OspA-5	CAC TAA TTG TTA AAG TGG AAG T	679 → 658	
OspA-6	GCA AAA TGT TAG CAG CCT TGA CG	54 → 76	392 bp
OspA-8	CTG TGT ATT CAA GTC TGG TTC C	445 → 424	

Jeder der äußeren Ansätze besaß ein Gesamtvolumen von 50 µl, das sich wie folgt zusammensetzte: 10 µl Proben-DNA, 0,1 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP; Fa. Roche), 10x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Fa. Promega), 1,5 U Taq-DNA Polymerase (Fa. Promega) und jeweils 0,25 µM Primer. Das Pipettieren der Ansätze erfolgte unter der Lamina auf Eis. Die Amplifikation erfolgte im Thermozykler (GeneAmp PCR System 2400, Fa. Perkin Elmer).

Für den inneren Ansatz wurden pro Ansatz 5 µl von dem jeweiligen Reaktionsgemisch des äußeren Ansatzes, 0,1 mM dNTP-Mix (dTTP, dATP, dCTP, dGTP; Fa. Roche), 10x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ (Fa. Promega), 1,5 U Taq-DNA Polymerase (Fa. Promega) und 0,125 µM je Primer zu einem Gesamtvolumen von 50 µl vermischt und im Thermozykler (GeneAmp PCR System 2400, Fa. Perkin Elmer) amplifiziert. Die nachfolgende Tabelle 6 erläutert den zeitlichen Ablauf der Zyklen des äußeren sowie inneren Ansatzes.

Tab. 6 Zyklusparameter der nested-PCR

Zyklusschritt	Außen			Innen		
	Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
Schmelzen	94°C	180 sec	1	94°C	180 sec	1
Amplifikation			30			25
→ Schmelzen	94°C	90 sec		94°C	90 sec	
→ Primerbindung	45°C	60 sec		55°C	60 sec	
→ Verlängerung	72°C	120 sec		72°C	120 sec	
Endverlängerung	70°C	10 min	1	70°C	10 min	1

Nach der DNA-Amplifikation des Probenmaterials erfolgte die Detektion der Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese.

Gelelektrophorese

Die Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe der horizontalen Flachbett-Gelelektrophorese in einem Wide Mini-Sub Cell GT System der Firma BIO-RAD aufgetrennt. Dabei kam ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 2%iges Agarosegel der Firma Invitrogen zum Einsatz (Herstellung siehe Anhang A).

Das Agarosegel wurde zum Kochen gebracht, anschließend auf 60°C abgekühlt und mit 3 µl Ethidiumbromidlösung versetzt. Das noch warme Gel wurde langsam in die vorgesehene Kammer gegossen, mit einem 15-zähligen Kamm bestückt und bis zur vollständigen Aushärtung (ca. 30 min) stehen gelassen (Herstellung siehe Anhang A). Nachdem das Gel polymerisiert war, wurde der Gelträger aus dem Gelgießstand entnommen und in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Anschließend erfolgte die Überschichtung des Gels mit 1x Elektrophoresepuffer und die vorsichtige Entfernung des Kammes.

10 µl je Probe sowie 10 µl der Positiv- als auch der Negativkontrolle wurden mit jeweils 2,5 µl Auftragspuffer (Fa. Biozym) auf einem Stück Parafilm vermischt und vorsichtig in die Geltaschen pipettiert. Zur Ermittlung des Molekulargewichtes der Amplifikate kam zusätzlich ein 100 bp DNA-Längenstandard (Fa. Roche) zum Einsatz. Die Elektrophoresekammer wurde danach verschlossen und einem Gleichstrom von 50 V über 2 h ausgesetzt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Photoauswertungssystems (Polaroid) dokumentiert. Die Entsorgung des kanzerogenen Ethidiumbromids erfolgte durch Bindung an Aktivkohle.

3.2.2. Indirekter Erregernachweis

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) und der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurden für den indirekten Nachweis einer Borrelieninfection verwendet. In dieser Arbeit konnte auf drei ELISA zurückgegriffen werden: zwei in Deutschland kommerziell erhältliche ELISA zur Bestimmung der IgG-AK gegen *B. burgdorferi* s.l. in Pferdeseren und einen im BgVV entwickelten ELISA zur Bestimmung von IgG-AK gegen *B. burgdorferi* s.l. beim Pferd.

3.2.2.1. Kommerziell erhältliche ELISA

Es kamen folgende kommerziell in Deutschland zugelassene ELISA zum Einsatz:

- A)** Medivet Borrelia equi ® von Medipan Diagnostica GmbH
(Zulassungsnummer: BGVV-B 313);
- B)** *B. burgdorferi* Veterinär ELISA ® von Genenzym Virotech GmbH
(Zulassungsnummer: BGVV-B 294).

ELISA **A** verwendet einen europäischen *B. afzelii*-Stamm als Antigen. Im Gegensatz dazu basierte ELISA **B** auf *B. burgdorferi* s.s-Antigen. Nachfolgend werden die für die einzelnen ELISA wichtigen Charakteristika aufgezählt:

ELISA A) Medivet Borrelia equi ® von Medipan Diagnostica GmbH

- quantitative Bestimmung von IgG-AK gegen *B. burgdorferi* s.l. in Pferdeseren
- Antigen: *B. afzelii* angereichert mit OspC
- Verdünnung der Pferdeseren: 1:50
- Konjugat: anti-horse IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase
- Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin)
- Stopplösung: Schwefelsäure
- Messung der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min
- die Stärke der Extinktion ist proportional der anti-Borrelien-IgG-AK
- Einschränkungen vom Hersteller: Das Flagellinprotein von *B. burgdorferi* zeigt geringe Variationen innerhalb der Spezies. Aufgrund von Sequenzhomologie am C- und N-Terminus mit Flagellinprotein anderer Spirochäten können auch kreuzreagierende AK nachgewiesen werden.

- Messbereich und Auswertung:

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgt anhand einer Standardkurve, die mit Hilfe der vier Kalibratorseren für jeden Test (ELISA-Platte) erneut erstellt wird:

< 200 U/ml = negativ

200-250 U/ml = fraglich

> 250 U/ml = positiv

ELISA B) *B. burgdorferi* Veterinär ELISA ® von Genozym Virotech GmbH

- semiquantitative und qualitative Bestimmung von AK gegen die Spezies *B. burgdorferi* s.l.

- Antigen: *B. burgdorferi* s.s.

- Verdünnung der Pferdeseren: 1:400

- Konjugat: anti-horse IgG, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase

- Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin)

- Stopplösung: Citrat

- Messung der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min

- Anmerkungen des Herstellers: Bei der Untersuchung von Pferdeseren, die AK gegen Leptospiren enthielten, wurden keine Kreuzreaktionen beobachtet.

- Messbereich und Auswertung:

Ratio in VE = Extinktion der Probe

(Virotech- Cut off

Einheiten)

Ratio < 8,0 VE = negativ

Ratio 8,0-12,0 VE = fraglich

Ratio ≥ 12,0 VE = positiv

Die Bestimmung der IgG-AK in den Pferdeseren erfolgte nach der Gebrauchsinformation der jeweiligen kommerziellen Testkits. Nachfolgend sind die für die Durchführung eines ELISA notwendigen Schritte beschrieben, wobei eine geringe Varianz in den einzelnen ELISA zu beachten ist:

1. Testreagenzien sowie Seren auf Raumtemperatur (RT) bringen und Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln
2. Kalibratoren 1-4 sowie die vorverdünnten Seren (ELISA A) oder gebrauchsfertigen Verdünnungspuffer (Leerwert), die Negativ- und die Positivkontrolle, den Cut off sowie die vorverdünnten Seren (ELISA B) in die jeweiligen Kavitäten der ELISA-Platte pipettieren (Doppelansatz)
3. Inkubation für 30 min bei 37°C
4. Dekantieren und 5x waschen

5. Zugabe des Konjugats in jede Kavität
6. Inkubation für 15 min (ELISA **A**) oder 30 min (ELISA **B**) bei 37°C
7. Dekantieren und 5x waschen
8. Zugabe des Substrates in jede Kavität
9. Inkubation für 15 min bei RT (ELISA **A**) oder 30 min bei 37°C (ELISA **B**) im Dunkeln
10. Zugabe der Stopplösung in jede Kavität zur Beendigung der Substratreaktion
11. Messen der Extinktion bei 450 nm gegen 620 nm innerhalb von 15 min

3.2.2.2. BgVV-ELISA

Der BgVV-ELISA agierte mit einem ultrabeschallten Antigen vom *B. garinii*, Stamm 1B29 und konnte zur qualitativen Bestimmung von IgG-AK gegen *B. burgdorferi* s.l. genutzt werden. Dieser Stamm wurde im Rahmen von epidemiologischen Untersuchungen zur Lyme-Borreliose (LB) in Berlin aus *Ixodes ricinus* isoliert (SCHÖNBERG et al., 1988). Die Spezifikation des Stammes erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Pettenkofer-Institut, München (MACEDO-AGUIRRE et al., 1996) und dem Pasteur-Institut, Paris (SAINT GIRONS et al., 1998).

Antigenherstellung

Das Ausgangsmaterial für die Antigenherstellung stellte die bei $-70 \pm 3^\circ\text{C}$ gelagerte *B. garinii*-Kultur (Stamm 1B29) dar.

Für die kulturelle Anzucht dieses Stammes wurde frisch hergestelltes modifiziertes BSK-Medium ohne Zusatz von Hemmstoffen verwendet (Rezeptur s. Anhang A). Nach positiver Sterilitätskontrolle (s. 3.2.1.1.) erfolgte die sterile Abfüllung des Mediums in 8 ml Schraubverschlussröhrchen (Fa. Falcon) zu jeweils 6 ml (mikroaerophiles Milieu). Sechs dieser Röhrchen wurden mit 0,3 ml bzw. einer Impföse der *B. garinii*-Kultur beimpft und für mindestens 4 Tage bei 33°C inkubiert. Die Kulturen wurden regelmäßig makroskopisch sowie mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie auf Borrelien untersucht. Die makroskopische Untersuchung beinhaltete die Registrierung von Verfärbung sowie Trübung (Bildung von Bodensatz) der Kultur. Mit Hilfe des Dunkelfeldmikroskopes (DFM) konnte das Wachstum, die Beweglichkeit, die Agglomeration sowie die Sterilität beurteilt werden.

Nach einem guten Wachstum wurden erneut 6 Röhrchen natives BSK-Medium beimpft. Bei Erreichen einer Dichte von 10^8 Borrelien/ml nach ca. 5 Tagen Inkubation bildeten diese die Vorkultur für die Beimpfung von zwei Kulturgefäßen à 200 ml (Fa. Greiner). Jedes Kulturgefäß beinhaltete 180 ml BSK-Medium und 15 ml der Vorkultur. Die Kulturen wurden

wiederum für 4-5 Tage bei 33°C inkubiert und makroskopisch sowie im DFM kontrolliert. Nach Erreichen der Keimzahl und Beimpfen von Blutplatten zur Sterilitätskontrolle wurde die *B. garinii*-Kultur in sterile 40 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 20 min bei 27000 g in der SS34-Rotor-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Antigen) mit sterilfiltriertem PBS-MgCl₂-Puffer (s. Anhang A) gewaschen. Dieser Vorgang wiederholte sich dreimal. Abschließend wurde das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Antigenpellets in 7 ml Waschpuffer resuspendiert und unter kontinuierlicher Eiskühlung durch Ultraschall aufgeschlossen (20 kHz, 5 x 1 min mit 1 min Pause). Um die Abtötung des Erregers zu beweisen, wurde ein BSK-Röhrchen mit einer Öse der beschallten Antigensuspension beimpft und für 4 Tage bei 33°C inkubiert. Makroskopisch (rosa Färbung blieb erhalten) sowie auch mikroskopisch (im DFM kein Erreger sichtbar) konnte kein Borreliennachweis geführt werden.

Zur Überprüfung der Sterilität des Antigens wurden nach der letzten Zentrifugation sowie von der Antigensuspension Blutplatten beimpft und diese für mindestens 3 Tage bei 37°C inkubiert.

Der Proteingehalt der Antigensuspension wurde mit Hilfe des DC Protein Assay Kit der Firma BIO-RAD bestimmt (Referenzwert: ca. 7 mg/ml). Anschließend erfolgte die Portionierung (à 0,5 ml), die Gefriertrocknung und die Lagerung bei 5 ± 3°C bis zum Einsatz des Lyophilisates.

Plattenbeschichtung

Für die Plattenbeschichtung des ELISA C wurde das lyophilisierte Antigen mit 0,5 ml Aqua bidest. resuspendiert. Die Resuspension wurde wiederum mit 4,5 ml Carbonatpuffer (s. Anhang A) verdünnt (entspricht einer Verdünnung von 1:10) und nochmals 4 x 10 sec mit 20 kHz unter Eiskühlung pulsbeschallt. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 20000 g für 10 min an. Der Überstand des Zentrifugates wurde gewonnen und 1:100 sowie 1:200 verdünnt. Für die Beschichtung der PS Microplatten (96 Well, F-Form, mittlere Bindung, Fa. Greiner) kamen 50 µl des jeweiligen verdünnten Antigens pro Kavität zum Einsatz. Danach wurden die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert, gewaschen sowie luftgetrocknet, einzeln vakuumverschweißt und anschließend bei Kühlschranktemperatur (5 ± 3°C) bis zum Gebrauch gelagert. Nachfolgend sind die notwendigen Schritte für die AG-Beschichtung beschrieben:

1. 1 ml 1:10 resuspendiertes und nochmals pulsbeschalltes Antigen mit 9 ml Carbonatpuffer (Endverdünnung 1:100) bzw. 19 ml Carbonatpuffer (Endverdünnung 1:200) verdünnen

2. Beschichtung der Platten mit der jeweiligen AG-Verdünnung (50 µl/Kavität)
3. Inkubation in der feuchten Kammer für 2 h bei 37°C
4. Waschen der Platten (3x Leitungswasser, 3x PBS-Tween 20)
5. Blockierung der freien Proteinbindungsstellen (Fremdprotein) mit Carbonatpuffer + 3%igem fötalen Kälberserum (FCS) jeweils 100µl/Kavität
6. Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min bei 37°C
7. Waschen der Platten (3x Leitungswasser, 3x PBS-Tween 20)
8. Lufttrocknen im Brutschrank bei 37°C bis zur vollständigen Trocknung
9. Verpacken in Plastikhüllen und vakuumverschweißen
10. Lagerung bei Kühlschranktemperatur ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)

Checkerboardsystem

Vor der Durchführung eines ELISA muss mit Hilfe der sogenannten Schachbrettitration die Arbeitsverdünnung für die im ELISA verwendeten immunologischen Reaktionspartner festgelegt werden. Dabei werden die zwei Reaktionspartner logarithmisch in dem vorgelegten Puffer verdünnt, wobei die erste (feste oder bekannte) Komponente von Reihe A-G vertikal in den Wells 1-12 und die zweite (unbekannte) Komponente horizontal in Kolumne 1-11 von Reihe A-H pipettiert wird. Reihe H sowie Kolumne 12 dienen jeweils als Negativkontrolle. Die gesuchte Verdünnung für den jeweiligen Reaktionspartner besitzt ihr Optimum, wenn die Extinktionswerte bei der photometrischen Bestimmung ein konstantes quantitativ bestimmbares Plateau erkennen lassen (sogenannte Plateaubildung).

Auf diese Weise wurden unter Einsatz von 2 x 2 Platten mit unterschiedlicher AG-Verdünnung die Arbeitsverdünnung der Seren einschließlich der positiven Kontrolle sowie das zu verwendende Konjugat festgelegt. Nachstehend sind die einzelnen Schritte des Checkerboards aufgeführt. Die Rezeptur der dabei verwendeten Substanzen befindet sich im Anhang A.

1. Verdünnung der positiven Kontrolle mit PBS-Tween 20 + 6%igem FCS von 1:100 bis 1:102400 (50 µl/Kavität von Kolumne 1 bis 11)
2. Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min bei 37°C
3. Dekantieren und 3x waschen (PBS-Tween 20)
4. Verdünnung der Konjugate a. und b. von 1:50 bis 1:3200 mit PBS-Tween 20 + 6%igem FCS (50 µl/Kavität von Reihe A bis G)
 - a. IgY anti horse IgG (H+L), BgVV
 - b. rabbit anti horse IgG (H+L), Fa. Sigma
5. Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min bei 37°C

6. Dekantieren und 3x waschen (PBS-Tween 20)
7. Beschichtung der Platten pro Kavität mit 100 µl Substratlösung (ABTS-Lsg. + 1%iges H₂O₂)
8. Inkubation für 30 min bei 37°C im Dunkeln
9. Abstoppen der Reaktion mit 25 µl Stopplösung pro Kavität
10. Messung der Extinktionswerte bei 450 nm

Nach der Durchführung des Checkerboards wurde das Extinktionsplateau der einzelnen Platten und somit die optimale Verdünnung der jeweiligen Reaktionspartner bestimmt. Daraus resultierte eine Festlegung der AG-Verdünnung auf 1:100. Die Entscheidung für das Konjugat fiel aufgrund der besseren Reaktivität auf das im BgVV hergestellte IgY anti horse IgG (H+L)/PO, das mit einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt wurde. Eine optimale Arbeitskonzentration für die Seren sowie für die Positivkontrolle konnte nicht gefunden werden, da eine gute Plateaubildung ausblieb. Somit wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800, die Positivkontrolle in einer Verdünnung von 1:200, 1:400 und 1:800 angewandt. Nach dem Erhalt des kompletten Datensatzes konnte retrospektiv mit Hilfe des SPSS-Statistikprogrammes (BÜHL und ZÖFEL, 2002) eine Serumverdünnung von 1:200 sowie die Verdünnung der Positivkontrolle von 1:400 festgelegt werden. Ausschließlich die Ergebnisse dieser Verdünnung gingen in die Auswertung der AK-Titerbestimmung ein (s. Auswertung des ELISA).

Durchführung des ELISA

Nachfolgend sind im einzelnen die zur Durchführung des ELISA notwendigen Schritte beschrieben. Die benötigten Reagenzien wurden nach der im Anhang A vermerkten Rezeptur hergestellt. Für die Positivkontrolle kam die Serumprobe Nr. 80 (in beiden kommerziellen ELISA positiv) zum Einsatz. Die Negativkontrolle entsprach dem Leerwert (Verdünnungspuffer). Die jeweiligen Verdünnungen der Seren und der Positivkontrolle sind ebenfalls nachfolgend aufgeführt:

1. Testreagenzien sowie Seren auf Raumtemperatur (RT) bringen und Flüssigkomponenten vor Gebrauch gut schütteln
2. Seren (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) sowie die Positivkontrolle (1:200, 1:400, 1:800) mit PBS-Tween 20 + 6%igem FCS (Verdünnungspuffer) vorverdünnen
3. Jeweils 50 µl der vorverdünnten Seren und der Positivkontrolle sowie des Verdünnungspuffers (Leerwert) in die Kavität der ELISA-Platte im Doppelansatz pipettieren

4. Inkubation in der Feuchtekammer für 30 min bei 37°C
5. Dekantieren und 3x waschen (PBS-Tween 20)
6. Zugabe von 50 µl Konjugat pro Kavität (IgY anti horse IgG (H+L)/PO)
7. Inkubation in der Feuchtekammer für 30 min bei 37°C
8. Dekantieren und 3x waschen (PBS-Tween 20)
9. Zugabe von 100 µl Substrat pro Kavität (ABTS-Lsg. + 1%iges H₂O₂)
10. Inkubation für 30 min bei 37°C im Dunkeln
11. Zugabe von 25 µl Stopplösung in jede Kavität
12. Messen der Extinktion bei 450 nm innerhalb von 15 min

Auswertung des ELISA

Mit Hilfe des Statistik-Programmes SPSS © 11.0 für Windows (SPSS © Inc., Chicago) erfolgte die Darstellung der Extinktionswerte der jeweiligen Serumverdünnung in einem Boxplot (Abb. 4).

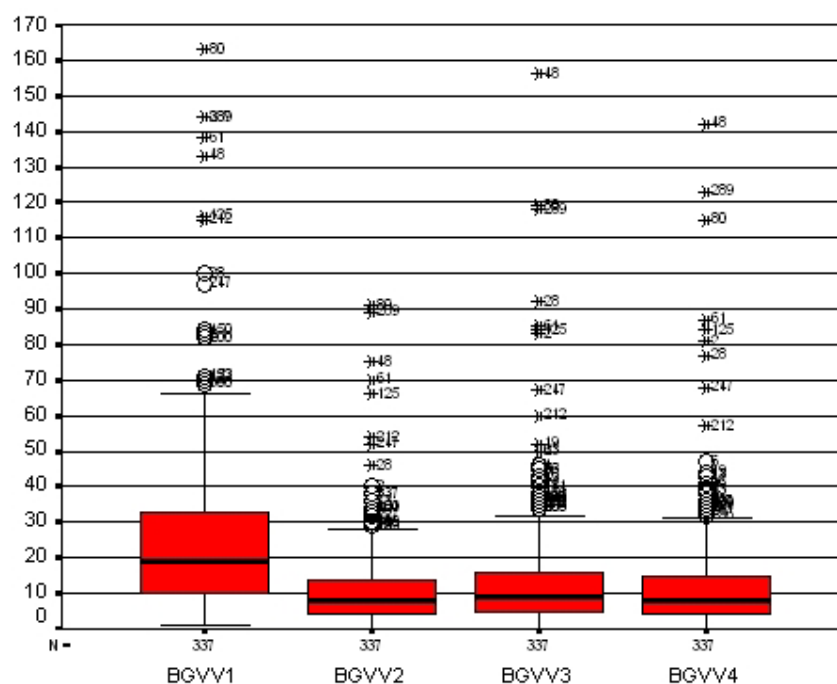


Abb. 4: Boxplot der Serumverdünnung 1:100 (BgVV 1), 1:200 (BgVV 2) 1:400 (BgVV 3) und 1:800 (BgVV 4)

Die Serumverdünnung 1:200 wurde für die Bestimmung des Messbereiches verwendet, da diese im Boxplot den geringsten Anteil an Ausreißern und Extremwerten zeigte. Nach dem

Logarithmieren der Extinktionswerte der Serumverdünnung 1:200 und Berechnung von Standardabweichung und Mittelwert (Abb. 5) konnte der Cut off nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Cut off in \%} = 3 \times \text{Standardabweichung} + \text{Mittelwert.}$$

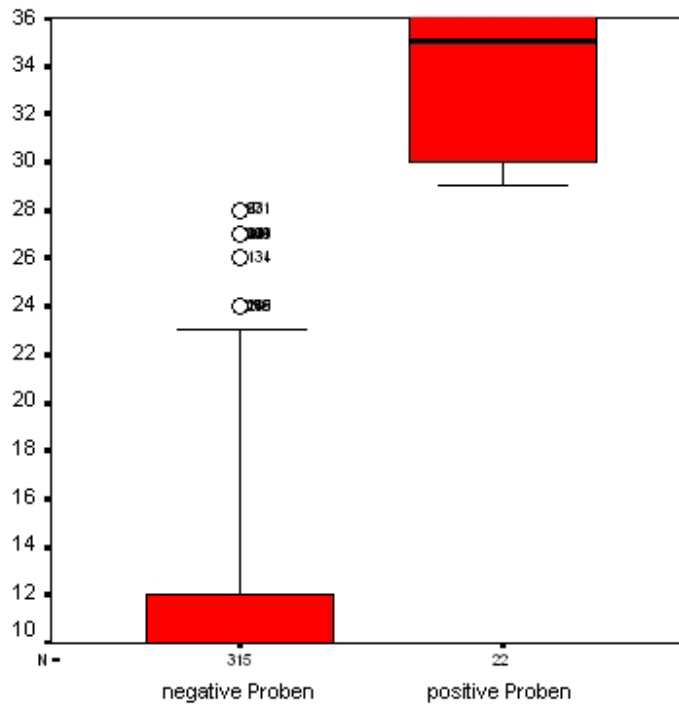


Abb. 5: Boxplot der Extinktionswerte der Serumverdünnung 1:200 (BgVV 2)

Der berechnete Cut off betrug 30 %, und eine Abweichung von +/- 5 % wurde eingeräumt. Damit konnte folgender Messbereich definiert werden:

- < 25 % = negativ
- 25-35 % = fraglich
- > 35 % = positiv.

3.2.2.3. Indirekter Immunfluoreszenztest

Der indirekte Immunfluoreszenztest (IFT) dient dem qualitativen Nachweis von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. in Pferdeseren. Dabei wird auf einem Objektträger das Antigen, in diesem Falle *B. garinii* (Stamm 1B29) als Vollantigen, fixiert und das zu bestimmende Serum

aufgetragen. Im Anschluss daran wird ein gegen die Spezies des Serumspenders gerichtetes Antiglobulin-Konjugat, das mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist, verwendet. Bei erfolgreicher AG-AK-Reaktion kann eine Fluoreszenz im Mikroskop beobachtet werden.

Antigenherstellung

Die Anzucht des Erregers erfolgte nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 3.2.2.2. beschrieben. Nach Erreichen der Keimzahl wurde die *B. garinii*-Kultur in sterile 40 ml Zentrifugenröhrchen verteilt und 20 min bei 20000 g in der SS34-Rotor-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Antigen) mit 1 ml sterilfiltriertem PBS-MgCl₂-Puffer (s. Anhang A) resuspendiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen mit Waschpuffer (s. Anhang A) aufgefüllt. Dieser Waschvorgang wiederholte sich 3x. Abschließend wurde das im Zentrifugenröhrchen verbliebene Antigenpellet in 1 ml sterilfiltriertem PBS-MgCl₂-Puffer resuspendiert und danach mit 9 ml PBS-MgCl₂-Formaldehyd (Endkonzentration 0,4%) verdünnt (entspricht einer Verdünnung von 1:10). Das Antigen wurde in eine Gewebekulturflasche überführt und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Sterilitätskontrolle beinhaltete die Beimpfung eines BSK-Röhrchens mit 0,3 ml dieser Kultur und eine anschließende Inkubation von 72 h bei 33°C. Makroskopisch (rosa Färbung blieb erhalten) sowie auch mikroskopisch konnte keine Begleitkontamination der Borrelienkultur mit Umweltkeimen beobachtet werden.

Die Aufbewahrung des Antigens erfolgte bei $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

Objektträgerbeschichtung

Für die Beschichtung der Objektträger (Fa. Medco, 12 Stellen) wurden 2x2 ml Antigen für 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Sedimente in je 1 ml Aqua bidest. resuspendiert. Danach erfolgte die Anlegung einer geometrischen Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:20480, wobei das Verdünnungsmedium Aqua bidest. darstellte. Anschließend wurden 20 µl der jeweiligen Verdünnung auf ein markiertes Feld des Objektträgers übertragen und dieser für 24 h zum Trocknen in den Kühlschrank verbracht. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Beurteilung der Borrelierverteilung auf dem Objektträger mit Hilfe des DFM (200fache Vergrößerung). Dabei sollte die Verdünnung, die die spätere Gebrauchsverdünnung darstellt, mindestens 30-40 Borrelien pro Gesichtsfeld enthalten (entspricht in diesem Fall einer Verdünnung von 1:500). Für die Herstellung der Gebrauchsverdünnung wurde das restliche Antigen in eine Petrischale (Ø 140 mm) gegeben, mit Aqua bidest. 1:500 verdünnt und auf dem Kreisschüttler geschwenkt (360 g).

Danach wurde das gebrauchsfertige Antigen auf die Objektträger (20 µl/Feld) verteilt und diese für 24 h im Kühlschrank getrocknet. Nach nochmaliger Kontrolle der Borrelienverteilung mit Hilfe des DFM wurden die Objektträger in Alufolie eingeschlagen und bei $-21 \pm 3^\circ\text{C}$ bis zur Anwendung für maximal 1 Jahr gelagert.

Durchführung des IFT

Vor Beginn des IFT sollten alle benötigten Reagenzien (Rezeptur im Anhang A) und Seren sowie Objektträger auf Raumtemperatur gebracht werden. Die Seren wurden mit PBS 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048 und 1:4096 vorverdünnt. Für die Positiv- als auch für die Negativkontrolle kam die Serumprobe Nr. 80 (in allen drei ELISA positiv) zum Einsatz. Dabei wurde für die Positivkontrolle das Serum 1:128, für die Negativkontrolle 1:2048 verdünnt. Sowohl von der jeweiligen Serumverdünnung als auch von der Positiv- und Negativkontrolle wurden 10 µl auf das vorgeschriebene Feld des Objektträgers pipettiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für 30 min bei 37°C . Danach wurden die Objektträger 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Parallel dazu wurde das Konjugat mit PBS 1:20 verdünnt und mit Evans blue (Verhältnis 1:500) versetzt. Nach dem Waschen erfolgte das Trocknen der Objektträger mit Zellstoff. Danach wurden 10 µl des Konjugats in jedes Feld des Objektträgers pipettiert. Eine Inkubation für 30 min bei 37°C schloss sich an. Nach dreimaligen Waschen der Objektträger mit PBS und anschließendem Trocknen erfolgte die Betrachtung der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung.

Auswertung des IFT

In vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen, in denen für die serologische Diagnostik einer Lyme-Borreliose beim Pferd der IFT Anwendung fand, wurde mit unterschiedlichen Grenztitern gearbeitet. So definierten BURGESS und Mitarbeiter (1986), POST und Mitarbeiter (1987) sowie MAGNARELLI und Mitarbeiter (1988) die Serumverdünnung von 1:64 als Grenztiter. Der gleiche Grenzbereich wurde von KÄSBOHRER und SCHÖNBERG (1990), GERHARDS und WOLLANKE (1996), VENNER und DEEGEN (1996) sowie LIEBISCH und Mitarbeiter (1999) angegeben.

Die Festlegung des Grenzbereiches in dieser Arbeit erfolgte bei einer Serumverdünnung von 1:128. Somit ergaben sich nachstehende Messbereiche, die für die Auswertung des IFT Verwendung fanden:

< 1:128 = negativ

≥ 1:128 = positiv.

3.2.3. Differentialblutbild

Für die hämatologische Untersuchung wurden mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) beschichtete 4 ml Röhrchen (Fa. Sarstedt) verwendet. EDTA ist ein bewährtes Antikoagulans, das die Verklumpung des Blutes, speziell der Leukozyten, verhindert (THOMAS, 1992; TAYLOR and HILLYER, 2001).

Die Röhrchen wurden bis zur 4 ml Markierung gefüllt und anschließend auf den Taumel-Rollenmischer (The Coulter Mixer, Fa. Northwell Drive) bis zur Bestimmung des Blutbildes mit Hilfe des Coulter T 840 der Fa. CC bewegt. Nach der Bestimmung von WBC (Konzentration der weißen Blutkörperchen), RBC (Konzentration der roten Blutkörperchen), Hb (Hämoglobingehalt), Hkt (Hämatokrit), MCV (Mittleres Erythrozytenvolumen), MCH (Mittlerer Hb-Gehalt des einzelnen Erythrozyten) und MCHC (Mittlere Hb-Konzentration der Erythrozyten) erfolgte der Blutausstrich. Dafür wurde ein kleiner Tropfen gut durchgemischten Blutes auf einen Objektträger verbracht. Der Blutstropfen sollte mit Hilfe eines Deckgläschens im Winkel von 45° so tangiert werden, dass die Kapillarkräfte das Blut gleichmäßig am Glasrand verteilen. Anschließend erfolgte mit einer einzigen, gleichmäßigen Vorwärtsbewegung der Ausstrich des Blutes über die gesamte Länge des Objektträgers. Der fertige Ausstrich wurde nach dem Lufttrocknen mit Hemacolor (Fa. Merck) gefärbt und danach unter dem Mikroskop (Fa. Carl Zeiss) bei 200facher Vergrößerung betrachtet. Dabei erfolgte die Auszählung sowie die Registrierung (Leucodiff-1050, Fa. Boskamp) von 100 kernhaltigen Zellen (stabkernige und segmentkernige neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, atypische Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten, Plasmazellen, Myeloblasten, Promyelozyten, Myelozyten sowie Metamyelozyten) im Blutausstrich, die letztendlich die prozentualen Anteile der o.g. Zellen angaben.

Für die Auswertung der in dieser Arbeit formulierten Fragestellung wurden nur die absolute Leukozytenkonzentration (10G/l) sowie der prozentuale Anteil an stabkernigen und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten im Blut der jeweiligen Probanden verwendet.

3.3. Externe labordiagnostische Untersuchungen

Diese Arbeit wurde von Herrn Dr. S. Brem vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim und von Herrn Dr. W. Müller vom Analytischen Labor ALOMED in Radolfzell unterstützt.

Der vom LGL an ausgewählten Seren sowie Liquores (n=15) durchgeführte ELISA sollte den Zusammenhang zwischen Serumverdünnung und Seropositivität darstellen.

Das LGL untersuchte mit Hilfe des ELISA 15 Liquor- sowie die dazugehörigen Serumproben auf das Vorhandensein von IgA-, IgM- und IgG-AK gegen *B. burgdorferi* s.l.. Das Probenmaterial stammte von Probanden, bei denen zusätzlich zur Serumgewinnung eine Liquorpunktion durchgeführt wurde. Die Antigenbeschichtung des ELISA erfolgte mit *B. garinii* (1B29) als Vollantigen. Für die IgG-Bestimmung der Seren wurden drei verschiedene Verdünnungen verwendet: 1:50, 1:200 und 1:400. Die Serumverdünnung für die Bestimmung von IgA und IgM war 1:50. Alle Liquores wurden für die Bestimmung von IgA, IgG und IgM in einer Verdünnung von 1:5 im ELISA eingesetzt.

Zur Überprüfung der Sensitivität der serologischen Tests wurde vom Labor ALOMED an einem Stichprobenumfang von 20 Seren ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 hochpositive Seren des ELISA **A**, **B**, und **C**, 3 in allen Tests negative Seren sowie die beiden Positivkontrollen der kommerziellen ELISA (ELISA **A** und **B**) untersucht. Der Nachweis von IgM- und IgG-AK in den 20 Seren erfolgte mit Hilfe von 8 rekombinanten *B. burgdorferi* s.l.-Antigenen. Zu den rekombinanten Antigenen zählten p100, p41, p39, OspA, OspC, p41 int. (*B. garinii*), p41 int. (*B. afzelii*) und p18, wobei p100, p39, OspC und p18 als hochspezifisch für *B. burgdorferi* s.l. angesehen werden. Die nachstehenden Tabellen geben das vom Labor ALOMED angewendete Punktesystem sowie das Beurteilungsschema an (Tab. 7 und 7a).

Tab. 7: Punktbewertung der gegen 8 rekombinante *B. burgdorferi*-Antigene gerichteten AK im Pferdeserum

Antigen- MG (kDa)	Name	Funktion/Herkunft	Phase	Punkte	
				IgM-AK	IgG-AK
100	p100	<i>B. afzelii</i>	spät	4	6
41	p41	Flagellin/ <i>B. burgdorferi</i> s.s.	alle	1	1
39	p39, BmpA	<i>B. afzelii</i>	alle	4	6
31	OspA	Oberflächenprotein <i>B. afzelii</i>	spät	2	2
22	OspC	Oberflächenprotein <i>B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i>	früh	8	8
20	p41/intern	spezif. Teil des Flagellins <i>B. garinii</i>	alle	2	2
18,5	p41/intern	spezif. Teil des Flagellins <i>B. afzelii</i>	alle	2	2
18	p18	Oberflächenprotein <i>B. afzelii</i>	spät	4	6

Tab. 7a: Beurteilungsschema des Western Blots

Summe der Punkte		Beurteilung IgM- und IgG-AK
IgM-AK	IgG-AK	
< 3	< 4	negativ
3 – 5	4 – 6	grenzwertig
6 – 10	7 – 11	schwach positiv
> 10	12 – 22	positiv
	> 12	stark positiv

Des Weiteren wurde vom Labor ALOMED eine LightCycler-PCR zur Überprüfung der Spezifität der nested-PCR durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine real-time Fluoreszenz-Detektion des *B. burgdorferi* s.l.-spezifischen Amplikons (260 bp), das sowohl als 1. als auch als 2. Spezifitätskriterium galt (das Primer- sowie das Sonderpaar sind zwei unabhängige Spezifitätskriterien für das nachzuweisende Amplikon). Ein zusätzliches drittes Spezifitätskriterium stellte die am LightCycler mit dem Amplifikat durchführbare Schmelzpunkt-Analyse dar. Diese diente der Ermittlung der für jedes Amplifikat charakteristischen Schmelztemperatur.

In der LightCycler-PCR wurden die positiven Proben der nested-PCR überprüft.

3.4. Statistische Auswertung

Die Datenerhebung erfolgte durch Eingabe in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp., Redmont). Die statistische Auswertung der Daten wurde am Fachbereich Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung und im Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin Berlin (BgVV) durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS © 11.0 für Windows (SPSS © Inc., Chicago).

Zur Beschreibung des Datenmaterials wurden arithmetischer Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Minima (min) und Maxima (max) sowie Stichprobenumfang (n) ausgewählt. Für die Beurteilung der Verteilung der Daten innerhalb eines Parameters konnte auf den Kolmogorov-Smirnov-Test zurückgegriffen werden.

Die statistische Überprüfung erfolgte bei zumeist ordinalen Werten im Gruppenvergleich mittels Chi-Quadrat-Test. Zum nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Beim Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben kam der H-Test nach Kruskal und Wallis zum Einsatz. Die Ergebnisse wurden als signifikant ($p \leq 0,05$) sowie nicht signifikant ($p > 0,05$) bewertet. Ergab sich beim Chi-Quadrat-Test ein signifikanter Zusammenhang, erfolgte die Bewertung auffälliger Zellen mit Hilfe der standardisierten Residuen (st.R.). Dabei zeigten st.R. $\geq 2,0$ eine signifikante, st.R. $\geq 2,6$ eine sehr signifikante und st.R. $\geq 3,3$ eine höchst signifikante Abweichung an.

Die Beurteilung der Korrelation zwischen zwei Parametern konnte bei intervallskalierten und normalverteilten Variablen mit Hilfe des Produkt-Moment-Korrelationstest nach Pearson (r_p) durchgeführt werden. Für den Vergleich von nicht normal verteilten metrischen Daten wurde die nicht-parametrische Rangkorrelation nach Spearman (r_s) verwendet.

Bei einigen Analysen war es sinnvoll, eine Darstellung mit Hilfe des Boxplots zu erstellen. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird und deren innere Linie den Median repräsentiert. Ferner werden der kleinste und der größte Wert markiert, sofern sie keine Ausreißer darstellen. Werte, die um mehr als drei Kantenlängen außerhalb der Box liegen (Extremwerte), werden im Boxplot mit einem Stern markiert. Werte, die um mehr als das Anderthalbfache der Kastenlänge außerhalb der Box liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet.