

## 5. Diskussion

Das Ziel dieser klinisch-diagnostischen Studie war es, herauszufinden, ob die derzeitige Praxis des indirekten Erregernachweises für die Diagnosestellung Lyme-Borreliose (LB) beim Pferd hilfreich ist und welche Rolle dem direkten Erregernachweis in der Routinediagnostik der LB zufällt. Für dieses Vorhaben war eine interdisziplinäre Zusammenarbeit mit dem Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin)\*, dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL, Oberschleißheim) und dem Analytischen Labor ALOMED (Radolfzell-Böhringen) erforderlich.

Die Schwierigkeit der klinischen Diagnostik einer LB in Europa beruht vor allem auf dem Fehlen eines definierten Krankheitsbildes und dem unterschiedlichen Erregerspektrum. Die aus Amerika stammenden Fallbeispiele sind allein durch *B. burgdorferi* s.s. verursacht und immer mit deutlicher Symptomatik verbunden. Hingegen zeigt sich das Erregerspektrum in Europa sehr vielfältig. Mittlerweile sind 13 Genospezies von *B. burgdorferi* s.l. in Europa bekannt, wovon mindestens drei einen pathogenen Charakter besitzen: *B. burgdorferi* s.s. ist meist mit Arthritis und Synovitis (Lyme-Arthritis), *B. garinii* mit der sogenannten Neuroborreliose und *B. afzelii* mit Hautmanifestationen assoziiert (VAN DAM et al., 1993; BALMELLI and PIFFARETTI, 1995; OSCHMANN et al., 1999; CUTLER and WOODWARD, 2001; BERGSTRÖM et al., 2002). Da Zecken, die potentiellen Überträger von *B. burgdorferi* s.l., meist nicht nur eine Borrelienart, sondern häufig verschiedene Spezies beherbergen, ist eine Mehrfachinfektion im Wirtsorganismus möglich (KLAPPER, 1999; LEUTENEGGER et al., 1999; PICHON et al., 1999; LAYFIELD and GUILFOILE, 2002). Daraus resultiert eine große Varianz von potentiellen Krankheitsbildern, die eine Diagnosestellung und damit die therapeutischen Maßnahmen massiv erschweren. Hinzu kommt, dass in Europa nur wenige apparente LB-Infektionen beobachtet wurden.

Bei einer seroepidemiologischen Studie in England registrierten BROWNING und Mitarbeiter (1993) einen Fall von Lahmheit beim Pferd, bei dem aufgrund der Anamnese, der klinischen Zeichen und der erfolgreichen antibiotischen Therapie die Verdachtsdiagnose LB gestellt werden konnte. Allerdings erfolgte keine Verifizierung der Diagnose mit Hilfe des direkten Erregernachweises.

---

\* seit dem 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

HAHN und Mitarbeiter berichteten 1996 erstmals detailliert über einen Borreliose-Fall in Großbritannien. Es handelte sich um eine 8jährige Vollblutstute, die seit 3 Wochen unter Lethargie, Anorexie, Fieber, Ataxie und Hyperästhesie am Kopf litt. Nach anfänglichem Behandlungserfolg mit Antibiotika verschlechterte sich ihr Zustand zusehends. Zu den beobachteten Symptomen zählten: Arthritis vor allem der Karpalgelenke, intermittierendes Fieber, Bewegungsunlust, Füllung der Sehnenscheiden, akute Uveitis, Hypersensitivität am Kopf, an den Beckengliedmaßen und in der Perinealregion, bis hin zu Depression, Kopfpresen, Stupor, Manegebewegungen, quadripedaler Ataxie und extremer Exzitation. Die Untersuchung der im Abstand von 2 und 4 Wochen gewonnenen Serumproben auf AK gegen *B. burgdorferi* s.l. mit Hilfe des ELISA war erfolgreich. Eine Isolierung von Borrelien-DNA gelang mit Ausnahme des Augenkammerwassers aus dem gesamten Probenmaterial. Ein Nachweis von mobilen Spirochäten konnte mittels Dunkelfeldmikroskopie geführt werden, der jedoch aufgrund von Kontamination nicht reproduzierbar war. In diesem Fall wurde erstmals eine LB-Erkrankung beim Pferd anhand der Symptomatik und der labordiagnostischen Untersuchungen mit Hilfe der PCR sowie des ELISA sicher diagnostiziert.

LIEBISCH und Mitarbeiter beschrieben 1999 die ersten LB-Verdachtsfälle bei Pferden in Deutschland. Dabei bezogen sie sich auf vier der beobachteten sechs Fälle. Die registrierten klinischen Zeichen waren vorrangig Polyarthrit, Endokarditis, Kachexie, beidseitige chronische Keratitis, diffuse Hyperkeratose und sarkoide Hautveränderungen. Der Nachweis von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. erfolgte mit Hilfe des IFT (Titerstufen von 1:128 bis 1:1024) und wurde durch den Western Blot bestätigt. Die kulturelle Anzüchtung von *B. burgdorferi* s.l. aus der Haut, der Synovia sowie der nach der Euthanasie entnommenen Gewebeproben (Lymphknoten, Lunge, Niere, Leber, Großhirn u.a.) gelang teilweise schon nach 24 Stunden. Diese erste Fallbeschreibung aus Deutschland wird jedoch kontrovers diskutiert, da keinem der akkreditierten Laboratorien jemals eine Kultivierung von Borrelien in dieser kurzen Zeit gelang. Die Verfasser berichteten außerdem, dass aus den zahlreich angegebenen Isolaten ohne Schwierigkeit Reinkulturen von *B. burgdorferi* s.l. angezüchtet werden konnten, wobei konkrete Angaben fehlten. Auch spätere Veröffentlichungen enthielten keine detaillierten Angaben zu den Ergebnissen (Liebisch et al., 2002). Erwähnung fand nur ein Isolat aus einer Milzprobe, das durch Sequenzanalyse mit *B. afzelii* identisch war und nach intraperitonealer Injektion aus Gelenkmaterial der Maus reisoliert werden konnte. Diese Darstellung erfolgte auf der Lyme-Borreliose Konferenz in New York (2002) und wurde von den anwesenden internationalen Experten aus o.g. Gründen sehr kritisch betrachtet (persönliche Mitteilung von SCHÖNBERG, 2002).

Weitere Fallbeispiele wurden bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beschrieben. Epidemiologischen Untersuchungen zufolge konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Seropositivität und Symptomatik im Sinne einer Lyme-Borreliose bei Pferden registriert werden (KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; CARTER et al., 1994; GERHARDS und WOLLANKE, 1996; VENNER und DEEGEN, 1996). Eine neue Studie aus Schweden zeigte jedoch eine Assoziation zwischen positivem AK-Nachweis und Gelenkserkrankungen auf (EGENVALL et al., 2001).

Die hier vorgestellten Fallbeispiele lassen die Vielzahl der möglichen Symptome einer LB beim Pferd erkennen. Viele dieser klinischen Zeichen können auch auf andere Erkrankungen zurückgeführt werden. Das Fehlen eines pathognomonischen Befundes in der klinischen sowie labordiagnostischen Beurteilung eines LB-Verdacht es erschwert daher die Stellung einer Kausaldiagnose.

### **5.1. Eignung der Probanden und des Untersuchungsmaterials**

Die Probanden wurden aus dem Patientengut der Klinik für Pferdekrankheiten, Allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin rekrutiert (n=337). Eine Auswahl der Probanden aus dem Patientenpool der Pferdekl i n i k erfolgte nicht, da alle Tiere, die innerhalb eines Zeitraumes von 10 Monaten in der Klinik vorstellig wurden, auf eine *B. burgdorferi* s.l.-Infektion hin untersucht worden sind. Die Pferde stammten ausschließlich aus Berlin/Brandenburg und standen somit für eine regional begrenzte epidemiologische Studie zum Vorkommen von *B. burgdorferi* s.l. zur Verfügung.

Jedes Tier wurde einer vollständigen klinischen Untersuchung nach propädeutischen Kriterien mit anschließender Blutprobenentnahme unterzogen. Nach der klinischen Untersuchung erfolgte die Einteilung der Probanden anhand ihrer Symptomatik in die Gruppen A und B. Die Gruppe A beinhaltete die Tiere ohne klinische Zeichen einer LB (n=195). Die Pferde aus der Gruppe B zeigten hingegen LB-ähnliche Symptome (n=142). Diese Einteilung erfolgte unabhängig von der im Anschluss an die klinische Untersuchung gestellten Diagnose, da ein einheitliches Krankheitsbild LB beim Pferd in Europa bis heute nicht existiert. So wurde in Anlehnung an die wenigen Fallbeispiele aus der europäischen Literatur eine Auswahl von potentiellen Symptomen getroffen und für die Gruppenbildung verwendet (HAHN et al., 1996; LIEBISCH et al., 1999). Die vielfältigen sowie individuell und regional abhängig beurteilten klinischen Zeichen umfassten viele Organsysteme und überschritten sich daher auch mit anderen Krankheitsbildern. Somit war eine begründete

klinische Verdachtsdiagnose „LB beim Pferd“ in dieser Studie nicht möglich. Die Beurteilung der Probanden hinsichtlich ihrer Symptomatik und der daraus folgenden Einteilung in die Gruppen A und B gestaltete sich durch die Vielzahl der möglichen LB-Symptome als sehr schwierig. Deshalb wurden die für jeden Patienten individuell erhobenen Befunde dem jeweilig erkrankten Organsystem zugeordnet, um so eine statistisch erfassbare Aussage zu den potentiellen Krankheitsbildern zu erhalten.

Bei einigen klinisch auffälligen Pferden im Sinne eines LB-Verdachts konnte zusätzlich zur Blutprobe weiteres Probenmaterial (Haut, Liquor, Synovia und Vollblut) für den direkten Erregernachweis gewonnen werden. Damit erfolgte der Versuch einer Verifizierung der Verdachtsdiagnose LB, der jedoch bei keinem der verdächtigen Fällen eindeutig gelang. Auf die Ursache des Versagens eines reproduzierbaren Nachweises von *B. burgdorferi* s.l. wird später eingegangen.

Die von jedem Pferd entnommene Blutprobe wurde innerhalb der nächsten 30 min zentrifugiert und bei  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  bis zur Untersuchung asserviert. Innerhalb dieser Zeit erfolgte auch das Anfertigen des Differentialblutbildes, da es nach 1 Stunde Lagerung von EDTA-Blut zur Lyse von Mono- sowie Granulozyten und somit zur Verfälschung des Blutausstriches kommen kann (THOMAS, 1992; TAYLOR and HILLYER, 2001).

Vom Probenmaterial Haut, Liquor, Synovia und Vollblut der klinisch auffälligen Patienten wurden innerhalb der nächsten 15 min Aliquots entnommen, davon eines kultiviert und das andere bei  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  bis zur Untersuchung gelagert. Nach GRABNER (persönliche Mitteilung, 2000) sowie THOMAS (1992) ist die Lagerung von Körperflüssigkeiten bei  $-21 \pm 3^\circ\text{C}$  für die Erhaltung der Spezifität von darin enthaltenen Antigenen sowie Antikörpern ausreichend.

Die Auswahl sowie die Bearbeitung des Probenmaterials erfolgte nach den aktuellen Vorschriften aus der Literatur (SCHÖNBERG et al., 1988; CHANG et al., 1999; PRIEM und KRAUSE, 1999; HEIDRICH, 2000; WILSKE et al., 2000).

## **5.2. Bewertung der Ergebnisse der labordiagnostischen Untersuchung**

### ***Direkter Erregernachweis***

Ein Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.-DNA gelang mit Hilfe der nested-PCR in 12 der 76 Proben. Allerdings konnte die LightCycler-PCR, durchgeführt vom Labor ALOMED, dieses Ergebnis nicht bestätigen.

Die nested-PCR und die LightCycler-PCR sind aufgrund der unterschiedlichen Primerwahl und der damit verbundenen Spezifität sowie Sensitivität nicht direkt miteinander vergleichbar. Die nested-PCR zeichnete sich durch zwei aufeinanderfolgende Durchläufe mit unterschiedlichen Ansätzen aus (äußerer und innerer Ansatz) und wurde zur Detektion des *B. burgdorferi* s.l.-spezifischen Amplikon 392 bp verwendet. Bei der LightCycler-PCR handelte es sich um eine real-time Fluoreszenz-Detektion des *B. burgdorferi* s.l.-spezifischen Amplikons (260 bp).

Dieser Sachverhalt verdeutlicht die Schwierigkeit in der Beurteilung von Spezifität und Sensitivität der PCR. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Primerauswahl, Extraktionstechnik sowie Reaktionsbedingungen variieren außerordentlich. Gleichzeitig existieren keine Vergleichsstudien. Hinzu kommt, dass wenige Laboratorien in der Lage sind, in ausreichender Qualität und Reproduzierbarkeit die Nukleinsäure-Amplifikations-Techniken durchzuführen (WILSKE et al., 2000).

Diese Fakten offenbaren, dass ohne eine Standardisierung der PCR-Methode eine vergleichende Bewertung des Probenmaterials nicht realisiert werden kann. Deshalb ist es dringend erforderlich, eine Vereinheitlichung der Primer und des PCR-Protokolls zu erreichen.

Unabhängig von dem Vorhandensein von Borrelien beweist ein positives PCR-Ergebnis nicht, ob es sich um intakte und somit vermehrungsfähige Erreger handelt. Diese können nur durch die kulturelle Anzucht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde jedoch kein Borrelienumwachstum in den Kulturen beobachtet. Ein Wachstum des Kontrollstammes war jedoch nachweisbar, was für die Funktionalität des Kultursystems spricht.

Die Anzucht von Spirochäten verlangt aufgrund ihrer langen Generationszeit von 10-20 Stunden im Vergleich zu anderen Bakterien und der hohen Ansprüche an die Zusammensetzung und Qualität der Kulturmedien besondere Sorgfalt. Dies trifft auch für *B. burgdorferi* s.l. zu und wurde bei der Auswahl und Präparation der verwendeten Medien entsprechend berücksichtigt. Das BSK-Medium gilt als das Standard-Medium für die Anzucht von Borrelien und wurde im LB-Labor des BgVV\* mit Erfolg für die Isolierung verschiedener Spezies von *B. burgdorferi* s.l. sowohl aus Zecken als auch aus Hautproben des Menschen eingesetzt (SCHÖNBERG et al., 1988; OTT und SCHÖNBERG, 1988; SCHÖNBERG et al., 1995; GUPTA et al., 1995; GRAY et al., 1996; KAHL et al., 1998).

---

\* seit dem 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

Das Wachstum des Kontrollstammes *B. garinii*, Stamm 1B29 (SCHÖNBERG et al., 1988) bestätigt die Leistungsfähigkeit der hergestellten Medien, die im Rahmen der Akkreditierung nach den in der Laborarbeitsanweisung „5-LA 169“ des BgVV enthaltenen Vorschriften vor ihrer Verwendung erfolgreich geprüft wurden.

Als Ergänzung wurde auch das MKP-Medium zur kulturellen Anzucht von Borrelien aus dem Probenmaterial verwendet. Mit diesem konnte das Referenzlabor für LB des Menschen (Pettenkofer-Institut, München) verschiedene Spezies von *B. burgdorferi* s.l. aus Haut, Liquor und Blut isolieren. Wenn auch in neueren Studien durch Zugabe von EMEM (engl. Eagle's Minimum Essential Medium) zum BSK-Medium im Verhältnis von 1:1 höhere Isolationsraten von *B. burgdorferi* s.l. aus Zecken (SPECK et al., 2002) erzielt wurden, so ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass der Nachweis von Borrelien aus Zeckenhomogenat sich wesentlich einfacher gestaltet.

Für die Beantwortung der Frage, warum die Isolierung von *B. burgdorferi* s.l. trotz Verwendung von optimalen Nährmedien nicht gelang, müssen verschiedene Gründe diskutiert werden. Einen großen Einfluss hat die vorhandene Keimzahl der Borrelien in der Probe, wobei der Anzuchterfolg durch anwesende Begleitkeime, deren Generationszeit weniger als 1 Stunde beträgt, erschwert wird. Um die Kontaminationen gering zu halten, wurden mit Erfolg Hemmstoffe eingesetzt und Subkulturen angelegt. Neben der Keimzahl der Borrelien ist auch der Anteil an lebenden Zellen und damit ihre Vermehrungsfähigkeit von großer Bedeutung. Je kürzer die Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Anlegen der Kulturen ist, um so erfolgreicher gestaltet sich die kulturelle Anzucht. So wurden in dieser Arbeit die Kulturen 15 Minuten nach Probenentnahme angelegt und bei 33°C bebrütet. Nach 24 Stunden erfolgte eine Subkultivierung. Diese Vorgehensart stellt eine optimale Voraussetzung für die kulturelle Anzucht des Erregers dar, die unter Praxisbedingungen nicht realisierbar ist.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Auswahl des Untersuchungsmaterials für den direkten Erregernachweis. Die Wahl der Biopsie- sowie der Punktionsstelle erfolgte in Abhängigkeit von der Lokalisation der Erkrankung. So wurde ein gefülltes Gelenk, das die Lahmheit verursachte, punktiert. Für die Diagnostik von neurologischen Erkrankungen war es naheliegend, eine Liquorpunktion im Spatium atlantooccipitale durchzuführen. Falls der Verursacher des Krankheitsbildes sich als *B. burgdorferi* s.l. herausstellte, wäre die Wahrscheinlichkeit seiner Anwesenheit im Liquor (immunologische Nische) relativ groß. Bei Hautveränderungen erfolgte die Biopsie am Übergang vom gesunden zum veränderten Gewebe. Hautproben können bei korrekter Aufbereitung ohne Schwierigkeiten kultiviert

werden. In der Humanmedizin finden sie vorrangig für den Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. bei dermatologischen Krankheitsbildern Anwendung (MANION et al., 1998; TALASKA, 1998a; CHANG et al., 1999; PRIEM und KRAUSE, 1999). Liquor und Synovia eignen sich ebenfalls gut für die kulturelle Anzucht, obwohl Borrelien aus Körperflüssigkeiten schlechter nachweisbar sind als aus Gewebeproben. Diese Regel gilt auch für den Nachweis von Borrelien-DNA mit Hilfe der PCR. Mit Hautbiopsaten und Liquor zeigte die PCR eine diagnostische Sensitivität von ca. 60% bzw. 25%. Bei Synoviaprobe wurde sogar eine Sensitivität zwischen 50-70% erreicht (WILSKE et al., 2000). Die Auswahl des Untersuchungsmaterials richtete sich somit nach den Anforderungen der MiQ 12/2000 – Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (WILSKE et al., 2000).

Nach unseren negativen kulturellen Ergebnissen ist es sehr erstaunlich, dass LIEBISCH und Mitarbeiter (1999) über eine Anzucht von *B. burgdorferi* s.l. aus der Haut des Pferdes berichten, die schon nach einer Inkubationszeit von 1-2 Tagen zum Erfolg führte. Einer persönlichen Mitteilung (LIEBISCH, 2001) zufolge wurde dabei nur BSK-Medium eingesetzt. Auch nach 5 Jahren ist aus dem umfangreichen internationalen Schrifttum kein Autor bekannt, der aus Proben von Tieren oder vom Menschen über eine Anzucht von *B. burgdorferi* s.l. nach dieser sehr kurzen Inkubationszeit berichtet. Daneben ist es wichtig, darauf hinzuweisen, dass die unbeweglichen spirochätenähnlichen Gebilde, die nach einer kurzen Inkubationszeit von 2 Tagen auftreten und durch Flagellen der Begleitkeime entstehen, irrtümlicherweise für Borrelien gehalten werden können (HEIDRICH et al., 1999). Bei den unbeweglichen spirochätenähnlichen Gebilden, die in einem Fall der vorliegenden Untersuchung auftraten, handelt es sich danach höchstwahrscheinlich auch um Flagellen der beweglichen Begleitkeime (s. Abb. 14).

Abschließend ist die Frage nach dem Vorhandensein von Borrelien in den Proben der LB-verdächtigen Pferde nicht zu beantworten, da eine kulturelle Anzucht in keinem der Fälle gelungen war und das positive Ergebnis in der nested-PCR mit Hilfe der Real-time-PCR nicht bestätigt wurde.

Bei der vergleichenden Betrachtung der beiden Methoden des direkten Erregernachweises ist zu beachten, dass ein positives PCR-Ergebnis eine LB weder ausschließen noch beweisen kann. Es ermöglicht lediglich einen Rückschluss auf das Vorhandensein des Erregers. Ob dieser noch infektiös oder bereits abgetötet ist, wird mit dem Verfahren nicht beantwortet. Die PCR sollte daher nur im Kontext anderer Nachweisverfahren und des klinischen Bildes durchgeführt werden (TALASKA, 1998a; PRIEM und KRAUSE, 1999).

Einen eindeutigen Beweis für das Vorhandensein infektiöser Borrelien liefert nur die kulturelle Anzucht, die sich aufgrund ihrer Ansprüche an die Kulturmedien sowie an die Inkubationsbedingungen jedoch schwierig gestaltet. Deshalb sollte der kulturelle Erregernachweis auf spezielle Indikationen, z.B. der Abklärung klinisch und serologisch nicht eindeutiger Befunde, beschränkt werden (WILSKE et al., 2000).

### **Indirekter Erregernachweis**

In der Gruppe A (Probanden ohne Symptomatik einer LB) wurden in den 3 verwendeten ELISA (s. Kap. 4.2.2.1. und 4.2.2.2.) folgende positive Antikörpertiter bestimmt **A**: 61,5%, **B**: 9,7%, **C**: 2,6%. Unter den LB-verdächtigen Pferden (Gruppe B) reagierten im ELISA **A**: 60,6%, **B**: 9,9%, **C**: 4,2% seropositiv. Somit kann im ELISA **A** eine Abnahme der seropositiven Reagenten in der borrelioseverdächtigen Gruppe registriert werden. Hingegen lassen ELISA **B** und **C** eine Zunahme der AK-positiven Pferde in Gruppe B erkennen. Beide Aussagen sind nicht signifikant und eher zufällig.

Bei der vergleichenden Betrachtung der ELISA **A**, **B** und **C** lässt sich eine große Diskrepanz in den serologischen Ergebnissen erkennen.

Eine Möglichkeit dieses diskordanten Resultats könnte in der Verwendung unterschiedlicher Antigene für den ELISA zu suchen sein. So bedient sich ELISA **A** der Spezies *B. afzelii* (angereichert mit OspC), ELISA **B** hingegen der Spezies *B. burgdorferi* s.s. und ELISA **C** der Spezies *B. garinii*. Viele der diagnostisch relevanten Proteine von *B. burgdorferi* s.l. besitzen eine erhebliche Inter-Spezies-Variabilität, die eine unterschiedliche Reaktivität mit Patientenserum zur Folge haben kann. Diese Differenzen können bei der Verwendung von Gesamtantigenen im ELISA zu Sensitivitätsunterschieden führen, die jedoch nach Aussagen von verschiedenen Studien für den IgG-Nachweis zu vernachlässigen sind (MAGNARELLI et al., 1994; HAUSER et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden nur ELISA für die Detektion von Immunglobulin G eingesetzt. Eine Bestimmung von IgM-AK für den Nachweis einer akuten Borrelieninfektion beim Tier ist nicht sicher möglich, da im Gegensatz zu anderen Infektionen IgM-AK bei einer LB sehr lange in hohen Konzentrationen im Serum persistieren können (HARTMANN, 2002).

Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand ist der Einsatz von ELISA, die eine Genospezies als Antigenbeschichtung aufweisen, für die Bestimmung von IgG ausreichend, wobei ihre Resultate gut vergleichbar sind (WILSKE et al., 2000). Hauser und Mitarbeiter (1998) registrierten allerdings bei einem ELISA mit *B. afzelii*-Antigenbeschichtung eine höhere

Sensitivität für lange zurückliegende Infektionen als bei einem ELISA mit anderer Genospezies-Beschichtung. PANELIUS und Mitarbeiter (2002) konnten eine stärkere Immunantwort auf das rOspC von *B. garinii* und *B. afzelii* als auf das rOspC von *B. burgdorferi* s.s. beobachten. Diese Studien implizieren eher eine Abhängigkeit zwischen Antigenbeschichtung im ELISA und AK-Nachweis. Somit bleibt offen, ob die unterschiedliche Antigenbeschichtung der ELISA eine Ursache für die abweichenden Resultate dieser Arbeit darstellt.

Eine weitere Diskussionsgrundlage bietet die unterschiedliche Verdünnungsmodalität in den einzelnen Tests. So werden die Seren im ELISA **A** bis 1:50, im ELISA **B** bis 1:400 und im ELISA **C** bis 1:200 verdünnt. Die Bestimmung der Serumverdünnung erfolgt in Kombination mit der Plattenbeschichtung, der Reaktionsfähigkeit des Konjugats sowie der Festlegung des Cut offs. Allerdings müssen die ELISA trotz unterschiedlicher Handhabung in der Anwendung ihrer Reagenzien eine analoge Aussage treffen. So konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung der Serumverdünnung von ELISA **A**, **B** und **C** im LGL-ELISA eine Angleichung der Ergebnisse der vier serologischen Nachweisverfahren erkennbar war. Bei einer Serumverdünnung entsprechend des ELISA **A** konnte demnach im LGL-ELISA eine annähernd gleiche Anzahl AK-positiver Pferde detektiert werden. Analog verhielt es sich zu ELISA **B** und **C**. Bisher sind derartige Vergleichsuntersuchungen mit verschiedenen ELISA-Systemen zum Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. noch nicht durchgeführt worden. HUNFELD und Mitarbeiter (2002) berichteten zwar auch von unstimmen Resultaten in den einzelnen serologischen Nachweisverfahren, die sie auf die unterschiedlichen Fabrikate der Tests sowie voneinander abweichende Methoden zurückführten, allerdings verglichen sie verschiedene Systeme wie ELISA, IFT, IHA und Western Blot miteinander. Die vorliegende Studie konnte jedoch zeigen, dass innerhalb eines Nachweisverfahrens die Testergebnisse aufgrund unterschiedlicher Rahmenbedingungen verschiedenartig ausfallen. Da der Probenumfang dieser Testreihe zu gering war, kann keine statistisch gesicherte Aussage über den Einfluss der angewandten Serumverdünnung getroffen werden.

Zur weiteren Abklärung der serologischen Ergebnisse wurden vom Labor ALOMED im Western Blot jeweils 5 hochpositive Seren der ELISA **A**, **B**, und **C**, 3 in allen Tests negative Seren sowie die beiden Positivkontrollen (PK) der einzigen in Deutschland kommerziell erhältlichen ELISA (**A** und **B**) untersucht. Die Positivkontrolle des ELISA **C** entsprach einer der hochpositiven Serumproben der ELISA. Der Nachweis von IgG-AK in den 20 Seren erfolgte mit Hilfe von 8 rekombinanten *B. burgdorferi* s.l.-Antigenen: p100, p41, p39, OspA, OspC, p41 int. (*B. garinii*), p41 int. (*B. afzelii*) und p18. Alle angegebenen rekombinanten Antigene zeichnen sich durch eine hohe Spezifität sowie Sensitivität aus und werden für den

Einsatz im Western Blot empfohlen (WILSKE et al., 2000). Der Immunoblot gilt nach dem Vorschalten des Suchtests (z.B. ELISA) als Bestätigungstest und besitzt die höchste Spezifität. Somit ist der Einsatz des Western Blots zur Überprüfung der ELISA zulässig.

Alle Seren konnten mit Hilfe des Western Blots bestätigt werden, die PK der kommerziellen ELISA allerdings nicht. Das bedeutet, dass die ELISA **A** und **B** keine definierte Positivkontrolle besitzen. Nach welchen Kriterien die PK bestimmt wurde, bleibt offen. Tatsache ist, dass das Fehlen einer definierten Positivkontrolle die Aussagefähigkeit hinsichtlich Spezifität sowie Sensitivität des ELISA in Frage stellt und als eine mögliche Ursache der Diskrepanz der ELISA-Ergebnisse angesehen werden muss.

Abschließend sind auch mögliche Fehler in der Anwendung der ELISA zu diskutieren. Die sehr häufig vorkommenden Pipettierfehler konnten durch Doppelansatz der Seren sowie der Kontrollen ausgeschlossen werden. Für alle Seren wurde eine Charge des jeweiligen ELISA verwendet, die eine konstante Zusammensetzung der Reagenzien sowie eine gleichbleibende Plattenbeschichtung garantiert.

Die Ergebnisse des IFT können aufgrund der unterschiedlichen Methodik nicht direkt mit den Ergebnissen der ELISA verglichen werden, müssen jedoch eine ähnliche Aussage treffen. So wurden mit Hilfe des IFT in Gruppe A 31,3% der Pferde und in Gruppe B 35,9% der Tiere seropositiv beurteilt. Damit ist der IFT nach unseren Ergebnissen zwischen ELISA **A** und **B** einzustufen. Im IFT erfolgte die Objektträgerbeschichtung wie auch im ELISA **C** mit *B. garinii*. Nach dieser Vorgabe wäre anzunehmen, dass eine gleiche Antigenpräsentation auch eine ähnliche Immunreaktion hervorruft. In dieser Arbeit wurde jedoch eine hohe Diskrepanz der serologischen Ergebnisse zwischen ELISA **C** und IFT beobachtet. Die Ursachen dafür können sehr vielfältig sein. Der Grenztiter wurde im IFT bei 1:128 festgelegt und somit um eine Titerstufe höher beurteilt als in vielen wissenschaftlichen Veröffentlichungen. Diese gaben einen Grenztiter für die serologische Diagnostik einer LB beim Pferd mit 1:64 an (BURGESS et al., 1986; POST et al., 1987; MAGNARELLI et al., 1988; KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; GERHARDS und WOLLANKE, 1996; VENNEN und DEEGEN, 1996; LIEBISCH et al., 1999). Selbst mit der Höhersetzung des Grenztiters konnte der IFT mehr seropositive Reagenten detektieren als der ELISA **C**. Gleichzeitig besteht die Möglichkeit, dass der Cut off im ELISA **C** zu hoch gewählt war und daher nur wenige seropositive Reagenten erfasst wurden. Da jedoch der Cut off für den ELISA **C** mit den derzeit gängigen Statistikprogrammen berechnet wurde, ist diese Annahme spekulativ und wird hier vernachlässigt. Weiterhin muss die Frage nach der Spezifität sowie Sensitivität des IFT gegenüber dem ELISA gestellt werden. Die Ergebnisse eines internationalen

Ringversuches zeigten, dass der ELISA eine bessere Reproduzierbarkeit sowie eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweist als der IFT (HUNFELD et al., 2002). Auch WILSKE und Mitarbeiter (2000) bestätigten diese Aussage. Damit muss der IFT qualitativ unter dem ELISA eingeordnet werden.

Ein Methodenvergleich in dieser Form wurde in der Veterinärmedizin bis heute nicht durchgeführt. In der Humanmedizin sind jedoch in den letzten Jahren verschiedene labordiagnostische Methoden zur Verifizierung einer LB verglichen worden. In den von TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA und Mitarbeitern (2002) durchgeführten Untersuchungen konnte eine Diskrepanz zwischen AK-Nachweis im ELISA und den mit Hilfe des Immunoblots dargestellten Proteinfractionen registriert werden. Bei einigen Patienten, bei denen ein Nachweis von Borrelien in der Kultur gelang, wurden fragliche sowie negative AK-Titer beobachtet.

RUZIC-SABLJIC und Mitarbeiter (2002) verglichen die serologischen Ergebnisse von Patienten mit Erythema migrans mit denen einer Kontrollgruppe und erhielten analoge AK-Befunde. Somit gestaltete sich die Immunantwort der zwei Gruppen unabhängig von den Nachweismethoden sehr ähnlich. Die serologischen Ergebnisse des IFT und des Western Blots divergierten jedoch stark.

Die Ergebnisse eines internationalen Ringversuches zur qualitativen Validierung von serologischen Nachweisverfahren einer Lyme-Borreliose, an dem insgesamt 367 mikrobiologische Laboratorien aus Deutschland sowie 13 anderen europäischen Staaten teilnahmen, zeigten eine große Variabilität. Gleichzeitig gestalteten sich die quantitativen Resultate und der Nachweis von spezifischen Immunoblotbanden sehr unbeständig (HUNFELD et al., 2002).

Selbst in der Humanmedizin ist der Nachweis einer LB aufgrund der unterschiedlichen labordiagnostischen Methoden und ihrer Aussagefähigkeit sehr schwierig. Deshalb sollten die Ergebnisse serologischer Tests und der direkte Erregernachweis immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild beurteilt werden (WILSKE et al., 2000).

### **5.3. Bewertung der anamnestischen und klinischen Parameter**

Vor der Beurteilung der Parameter der klinischen Untersuchung muss darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der diskordanten Ergebnisse der direkten und indirekten

Testverfahren keine statistisch gesicherte Aussage zum Auftreten einer LB beim Pferd in Berlin/Brandenburg getroffen werden kann. Es soll jedoch versucht werden, die Wechselwirkungen zwischen Umwelt und Individuum, die eine Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. begünstigen, darzustellen sowie die Risikofaktoren einer LB-Erkrankung aufzuzeigen.

Mit zunehmendem **Alter** konnte ein signifikanter Anstieg der seropositiven Reagenten in allen serologischen Testverfahren beobachtet werden. Pferde besitzen mit steigendem Lebensalter temporär betrachtet eine erhöhte potentielle Zeckenexposition und damit ein erhöhtes Risiko einer Borrelieninfektion. Unter Berücksichtigung der möglichen AK-Persistenz oder eventuellen Reinfektionen steigt die Wahrscheinlichkeit der AK-Bildung gegen *B. burgdorferi* s.l. im Alter an. Hingegen stehen junge Pferde dem Risiko eines Zeckenbefalls und damit dem Erreger der LB auf das Lebensalter bezogen seltener gegenüber. Somit liegt nahe, dass eine Borrelieninfektion bei älteren Pferden signifikant häufiger diagnostiziert wird als bei jüngeren Tieren.

Die **Geschlecht**verteilung der Gruppen A und B war relativ ausgewogen. Allerdings konnte in Gruppe A eine signifikante Häufung von seronegativen Hengsten im IFT registriert werden. Diese Sachverhalte lassen sich jedoch anhand der Haltungsbedingungen der Hengste erklären, da die männlichen Tiere aufgrund ihrer besonderen Handhabung (Vermeidung von Rangkämpfen sowie Fehldeckungen) zum großen Teil im Stall ohne oder nur mit gelegentlichem Weidegang und eingeschränktem Kontakt zu anderen Pferden gehalten werden. Somit sind Hengste einer geringeren Zeckenexposition ausgesetzt als Stuten und Wallache, die bevorzugt auf der Weide stehen. Daraus folgt ein verringertes Risiko für eine Borrelieninfektion und somit auch ein geringerer Nachweis von AK-positiven Hengsten. Das impliziert wiederum, dass apparente Infektionen und ihre Symptome eher selten zu erwarten sind.

Eine **Rassedisposition** für eine Borrelieninfektion ist auszuschließen, jedoch besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Haltung, der Rassezugehörigkeit und dem AK-Nachweis. So werden Traber und Vollblüter vorrangig in Ställen ohne Zugang zu Weide oder eventuell mit Paddockauslauf gehalten. Damit wird die Kontaktmöglichkeit zu Zecken verringert und gleichzeitig die Infektionsgefahr mit *B. burgdorferi* s.l. gesenkt. Somit kann auch die geringe Anzahl von seropositiven Reagenten in dieser Rasse erklärt werden, was wiederum eine Symptomatik im Sinne einer LB unwahrscheinlich macht.

Kleinpferde hingegen zeigten in dieser Arbeit häufig hohe AK-Titer gegen *B. burgdorferi* s.l. Da die Rasse gern in Offenställen gehalten wird, sind diese Tiere einer hohen

Zeckenexposition ausgesetzt. Das Risiko einer Borrelieninfektion steigt somit, und der Nachweis von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. wird sehr wahrscheinlich.

Mit zunehmendem Wald- bzw. Wiesen- und damit Zeckenkontakt, der in Abhängigkeit zur **Haltungsart** der Tiere steht, erhöht sich die Prädisposition für eine Borrelieninfektion. So konnten bei Pferden in Offenstallhaltung häufiger AK gegen *B. burgdorferi* s.l. registriert werden als bei Tieren in Paddockhaltung. Gleichzeitig wurden bei den im Offenstall gehaltenen Pferden auch vermehrt klinische Zeichen einer LB beobachtet. Ob die seropositiven Tiere eine apparente LB-Infektion aufwiesen, ist spekulativ und soll hier vorerst zurückgestellt werden.

Die **Nutzungsrichtung** korreliert sehr eng mit der Haltungsform. So werden Renn- und Turnierpferde eher im Stall ohne Auslaufmöglichkeiten oder mit Paddockauslauf gehalten. Hingegen steht dem Freizeitpferd oft permanent oder überwiegend Weide zur Verfügung. Somit ist die Zeckenbefallsrate und damit auch der AK-Nachweis gegen *B. burgdorferi* s.l. bei Rennpferden geringer als bei Freizeitpferden. Das erklärt auch die Tatsache, dass Tiere, die im Rennsport/Trabrennsport ihren Einsatz finden, signifikant häufiger einen seronegativen AK-Befund im IFT zeigten als anderweitig genutzte Pferde.

Anhand der Befragung des Besitzers konnte retrospektiv ein möglicher **Zeckenbefall** beim Pferd registriert werden. Dieser Anamnese punkt birgt jedoch eine hohe Fehlerquote in sich. Die Beobachtung von Zecken seitens des Besitzers ist abhängig von der Kontaktintensität zum Tier. So ist es möglich, dass das Pferd zwar Zecken über einen gewissen Zeitraum aufwies, diese allerdings vom Besitzer aufgrund des fehlenden Kontaktes zu dieser Zeit nicht beobachtet wurden. Gleichzeitig kann ein Befall mit Larven (relativ unwahrscheinlich, da jene Kleinnager bevorzugen) oder Nymphen dem Besitzer durch ihre geringe Größe optisch entgangen sein (BEDER, 1988). Die somit entstandenen falsch negativen Angaben erschweren die Aussage über das Risiko einer Borrelieninfektion bei Zeckenbefall in Berlin/Brandenburg.

In der vorliegenden Studie konnte eine Häufung von Pferden mit beobachtetem Zeckenbefall in der Gruppe der LB-verdächtigen Tiere registriert werden. Die Ursache dieser Tatsache ist vermutlich beim Pferdebesitzer selbst zu suchen, der durch aktuelle Artikel in diversen Zeitschriften, die momentan die Möglichkeiten einer Lyme-Borreliose (LB) beim Pferd und deren Symptome kontrovers diskutieren, sensibilisiert wurde und nun eine LB-Infektion bei seinem Tier vermutet. Da die klinischen Zeichen einer LB so vielfältig sind, wird oft das Pferd mit passender Symptomatik im Sinne einer LB dem Tierarzt vorgestellt. Bei einer Befragung von Tierärzten aus Deutschland war der Hinweis des Besitzers, dass sein Pferd

wahrscheinlich an LB erkrankt ist, der häufigste Grund der Diagnosestellung Lyme-Borelliose (persönliche Mitteilung von GALL, 2004).

Natürlich besteht auch die Möglichkeit, dass die beobachteten Zecken Borrelien auf das Pferd übertragen haben und bei ihm Symptome einer LB verursachten. Allerdings ist diese Annahme nicht eindeutig beweisbar, da ein Zusammenhang zwischen der Anzahl seropositiver Tiere mit beobachtetem Zeckenbefall und der Anzahl seronegativer Tiere mit beobachtetem Zeckenbefall je nach serologischem Test mehr oder weniger bestand. So zeigten in den ELISA **B** und **C** sowie im IFT die Pferde, bei denen Zecken beobachtet werden konnten, signifikant häufiger einen seropositiven Befund als Pferde ohne beobachtetem Zeckenbefall. Hingegen konnte im ELISA **A** kein deutlicher Unterschied zwischen seropositiven Reagenten und beobachtetem Zeckenbefall registriert werden. Hinzu kommt, dass in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine apparente Infektion bei den Probanden vorlag. Somit muss angenommen werden, dass keines der beobachteten Symptome auf eine LB-Erkrankung zurückzuführen ist. Abschließend betrachtet, erhöht sich jedoch das Risiko einer *B. burgdorferi* s.l.-Infektion mit Zunahme des Zeckenkontaktes. Inwiefern die Infestation des Erregers eine apparente Infektion verursacht, bleibt offen.

Die Beurteilung der klinischen Parameter soll an dieser Stelle nur der Vollständigkeit wegen durchgeführt werden, da eine Vorauswahl der Parameter Ernährungszustand, Temperatur und Symptomatik erfolgte und diese somit für eine statistisch fundierte Aussage nicht zur Verfügung stehen.

Der Parameter **Allgemeinzustand** ist für die Charakterisierung einer LB ungeeignet, da ein gestörter Allgemeinzustand in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium kein typisches LB-Symptom darstellt. Somit konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Beurteilung dieses Parameters ermittelt werden. Ein Zusammenhang zwischen AK-Nachweis und Allgemeinzustand des Probanden wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Ein schlechter **Ernährungszustand** sowie Fieber zählen zu den in der Literatur beschriebenen LB-Symptomen. Damit wurde bei diesen zwei Parametern eine Vorauswahl getroffen, die eine statistische Auswertung hinsichtlich des Gruppenvergleiches hinfällig werden lässt. Der Nachweis von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. aller serologischer Testverfahren zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ernährungszuständen gut, mäßig sowie schlecht.

Sowohl bei Pferden mit Untertemperatur oder Fieber als auch bei Tieren, die eine physiologische **Körpertemperatur** aufwiesen, wurden ähnlich viele seropositive Reagenten detektiert.

Die Gruppeneinteilung basierte auf der Beurteilung der **Symptomatik**. Somit wurden in Gruppe B nur LB-verdächtige Pferde registriert, die vor allem Erkrankungen des Bewegungsapparates, der Haut, des zentralen sowie peripheren Nervensystems, des Auges und des Herz-Kreislaufapparates (beinhaltet die Leistungsschwäche) aufwiesen. In der Gruppe A befanden sich vorrangig klinisch unauffällige Pferde sowie Tiere mit Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, des Atmungsapparates oder sonstigen Erkrankungen. Interessant war, dass in beiden Gruppen gleichermaßen seropositive Tiere mit Hilfe der serologischen Testverfahren nachgewiesen wurden.

Pathologische **Blutparameter** und ihre diagnostische Wertigkeit hinsichtlich einer LB sind vorrangig für die Humanmedizin beschrieben. So wird beim Menschen im Stadium 1 eine Leukozytose mit Linksverschiebung registriert (STEERE et al., 1983), die auch bei 12 SPF-Hunden am 85. Tag p. inf. von JENAL (2002) beobachtet werden konnte. Eine milde Leukozytose beim Pferd registrierten sowohl BROWNING und Mitarbeiter (1993) als auch HAHN und Mitarbeiter (1996). Eine Leukozytose stellt jedoch kein pathognomonisches Zeichen einer LB dar, allerdings gibt sie einen Hinweis auf das Vorliegen einer bakteriellen Infektion. Somit wurde dieser Parameter für die klinische Beurteilung einer Borrelioseninfektion bei den Probanden herangezogen. Bei der Gegenüberstellung der Gruppen A und B konnte kein signifikanter Unterschied im Auftreten einer Leukozytose beobachtet werden. Ebenso gestaltete sich der Anteil von seropositiven Tieren in Gruppe A und B ähnlich. Für die Abklärung der Verdachtsdiagnose LB ist dieser Parameter somit ungeeignet.

#### **5.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse der klinischen und der labordiagnostischen Untersuchungen**

Der Nachweis von Antikörper (AK) gestaltete sich in Abhängigkeit von dem Testverfahren unterschiedlich. So wurden im ELISA A 61,1%, im ELISA B 9,8% und im ELISA C 3,3% der Tiere seropositiv bewertet. Der IFT detektierte bei einem Grenztiter von 1:128 33,2% AK-positive Pferde. Durch diese diskordanten Ergebnisse ist eine Aussage hinsichtlich der Beurteilung der AK-Titer sowie ihrer klinischen Bedeutung unmöglich. Hinzu kommt, dass weder in der Kultur noch in der PCR ein reproduzierbarer Erregernachweis gelang. Jedoch beweist der Nachweis von AK gegen *B. burgdorferi* s.l. unabhängig von den Ergebnissen der

serologischen Testverfahren einen Antigenkontakt der untersuchten Pferde. Ob dem eine apparente Infektion resp. Erkrankung der Probanden folgte, kann diese Arbeit nicht belegen. Zwar wurden AK-positive Tiere in der Gruppe der Pferde mit LB-ähnlichen Symptomen (Gruppe B) registriert, allerdings war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der seropositiven Reagenten zwischen den Gruppen A und B erkennbar. Selbst die im Western Blot bestätigten seropositiven Tiere wiesen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen klinischen Zeichen einer Lyme-Borreliose (LB) und AK-Titer auf. Es sei darauf hingewiesen, dass die hier registrierten Symptome auch auf andere Erkrankungen zurückgeführt werden können. Durch das Fehlen eines pathognomonischen Zeichens in der klinischen Beurteilung eines LB-Verdacht ist die Stellung einer kausalen Diagnose unmöglich. Somit beschränkt sich die Betrachtung der klinischen und labordiagnostischen Ergebnisse allein auf den AK-Nachweis bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Pferden.

Antikörper (AK) werden nach dem Eindringen und der Vermehrung von Mikroorganismen, was eine Infektion kennzeichnet, im Makroorganismus gebildet. In Abhängigkeit von der Virulenz des Erregers sowie der Reaktionsbereitschaft des befallenen Wirtes kann eine Infektionskrankheit, die mit sichtbarer Symptomatik einhergeht, entstehen. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wäre zu diskutieren, ob Pferde in der Lage sind, den Erreger der LB zu eliminieren oder ob sie zu inapparenten Infektionen neigen.

Beim Tier werden bereits ab 4 Wochen post infectionem AK (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.l. gebildet (LIEBISCH, 1993). In der Regel geht dem Auftreten von klinischen Zeichen einer LB die humorale AK-Bildung voraus. Jedoch kann auch beim gesunden Tier eine Titerdynamik beobachtet werden, die in manchen Fällen sogar spontanen Schwankungen unterliegt und damit die Diagnose einer LB erschwert (BAUMEISTER, 1999).

Untersuchungen zum Verlauf einer LB-Infektion beim Pferd liegen nicht vor, somit ist eine Einschätzung der humoralen Immunantwort hinsichtlich Zeit und Verlauf bei dieser Tierart erschwert. DIVERS und Mitarbeiter (2003) konnten bei Infektionsversuchen mittels Zeckenansatz an Ponys eine Antikörperbildung mit dem ELISA nach 5-6 Wochen detektieren. Ein hoher AK-Titer wurde jedoch erst ab dem 3. Monat p. inf. beobachtet, der bis zur Euthanasie der Tiere, die nach 9 Monaten erfolgte, konstant blieb.

Seroepidemiologische Studien lassen erkennen, dass Pferde sich oft mit dem Erreger auseinandersetzen müssen (MAGNARELLI et al., 1988; LINDENMAYER et al., 1989; MAGNARELLI and ANDERSON, 1989; BERNARD et al., 1990; COHEN and COHEN, 1990; KÄSBOHRER und SCHÖNBERG, 1990; COHEN et al., 1992; MALONEY and LINDENMAYER, 1992; BROWNING et al., 1993; TASAI et al., 1993; CARTER et al., 1994; GERHARDS und WOLLANKE, 1996; LIEBISCH et al., 1999; MAGNARELLI et al., 2000; EGENVALL et al., 2001). Die

Interpretation der AK-Titer gestaltet sich jedoch schwierig, da allein mit seropositiven Ergebnissen nicht zwischen dem Vorliegen einer Lyme-Borreliose, einer klinisch inapparenten Infektion und residualen AK-Titern sicher unterschieden werden kann. Hinzu kommt, dass bei Pferden häufig eine AK-Persistenz beobachtet wird. Somit besteht die Möglichkeit eines AK-Nachweises trotz längst zurückliegender *B. burgdorferi* s.l.-Infektion. Um eine Bewertung eines akuten Infektionsgeschehens zu erhalten, empfiehlt es sich, eine Verlaufsuntersuchung durchzuführen. So werden von betroffenen Tieren im Abstand von mindestens 4 Wochen zwei Serumproben entnommen, um eine evtl. vorhandene AK-Dynamik darzustellen.

Weiterhin muss auf die Möglichkeit einer sowohl falsch-positiven als auch falsch-negativen Befunderhebung hingewiesen werden. Falsch-positive Befunde können vor allem durch Kreuzreaktionen bedingt sein, die durch Leptospiren, gramnegative Enterobakterien sowie apathogene Spirochäten aus dem Magen-Darm-Trakt verursacht werden (MAGNARELLI et al., 1987a; KASBOHRER and SCHÖNBERG, 1990; TALASKA, 1998b). Bei den heute empfohlenen serologischen Nachweisverfahren handelt es sich jedoch vorrangig um Tests der 2. oder 3. Generation, die falsch-positive Reaktionen weitgehend vermeiden helfen. Falsch-negative Befunde können testbedingt oder biologisch bedingt sein. So können z.B. hohe unspezifische Hintergrundreaktionen zu einer unzureichenden Sensitivität beitragen. Auch Antigenunterschiede zwischen Testantigen und Erreger des Patienten werden vermutet. Gleichfalls kann eine mangelhafte Expression diagnostisch relevanter Proteine bei den zur Antigenherstellung verwendeten Stämmen zu falsch-negativen Resultaten führen (WILSKE et al., 2000). Den häufigsten Grund stellt jedoch die diagnostische Lücke dar, die vor allem durch Lokalisation und Stadium der Manifestation der LB bedingt ist. Da eine Einteilung der vielfältigen Symptome in Stadien, wie es beim Menschen praktiziert wird, beim Tier nicht möglich ist, besteht die Gefahr einer Fehlinterpretation des AK-Nachweises hinsichtlich einer apparenten Infektion.

In der Humanmedizin wurde in den vergangenen Jahren des öfteren von sogenannten seronegativen LB-Patienten berichtet (DEJMKOVA et al., 2002). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte in den besonderen Pathogenitätsmechanismen von *B. burgdorferi* s.l. zu suchen sein. Borrelien besitzen die Fähigkeit, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, indem sie z.B. wirtseigene Zellen penetrieren oder wirtseigene Oberflächenantigene präsentieren (HERZER, 1990; SCOTT HEFTY et al., 2002; ZIPFEL et al., 2002). Diese Maskierung kann grundsätzlich auch beim Pferd auftreten.

Die in der Humanmedizin beschriebenen Spätmanifestationen einer LB müssen auch in der hier geführten Diskussion Berücksichtigung finden (CIMMINO et al., 1998; STANEK, 1998). Da keine Untersuchungen über das Auftreten von evtl. Spätfolgen einer *B. burgdorferi* s.l.-Infektion beim Tier, speziell beim Pferd, vorliegen, müssen epidemiologische Langzeitstudien durchgeführt werden, um eine Aussage über Spätmanifestationen beim Pferd treffen zu können.

### **5.5. Schlussbetrachtung und Ausblick**

Abschließend betrachtet, besteht durchaus die Möglichkeit einer Infektion mit *B. burgdorferi* s.l. beim Pferd in Berlin/Brandenburg. Ob diese Infektion sich apparent oder inapparent äußert, ist vom Individuum und den Umweltbedingungen abhängig. So kann extensiver Kontakt zu Wiesen und Wäldern die Zeckenbefallsrate und somit auch die Gefahr einer Borrelieninfektion erhöhen. Hinzu kommen individuelle Kriterien des Pferdes wie Alter, Immunstatus und Reaktionsfähigkeit des Körpers, die eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Ausprägung einer LB-Erkrankung spielen.

Die widersprüchlichen Resultate der serologischen Tests implizieren die Dringlichkeit der Evaluierung von indirekten Nachweisverfahren von *B. burgdorferi* s.l. in der Labordiagnostik. Gleichzeitig muss eine Standardisierung der direkten Nachweisverfahren, speziell der kulturellen Anzucht und der PCR, angestrebt werden, um eine Verifizierung der Verdachtsdiagnose LB beim Pferd zu ermöglichen. Ohne zuverlässige Nutzung dieser diagnostischen Wegbereiter wird man weiterhin vom Phänomen einer „Lyme-Borreliose beim Pferd“ sprechen.