

6. Zusammenfassung

Die Verdachtsdiagnose Lyme-Borreliose wird beim Pferd häufig durch den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia (B.) burgdorferi* sensu lato (s.l.) im Zusammenhang mit der in der Literatur beschriebenen Symptomatik gestellt. Ein direkter Nachweis von Borrelien aus Probenmaterial gestaltet sich durch die fehlende Standardisierung der Tests sehr schwierig. Die vorliegende Arbeit versuchte zu klären, ob die derzeitige Praxis des indirekten Erregernachweises für die Diagnosestellung Lyme-Borreliose (LB) beim Pferd geeignet ist und welche Rolle dem direkten Erregernachweis in der Routinediagnostik der LB zufällt.

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 LB untersucht. Die Einteilung der Probanden in Gruppe A (Pferde ohne auffällige Symptomatik im Sinne einer LB, n=195) und Gruppe B (Pferde mit LB-ähnlichen Symptomen, n=142) erfolgte im Anschluss an die vollständige klinische Untersuchung. Mit Hilfe von 2 kommerziell erhältlichen ELISA (**A** und **B**), einen im BgVV¹ entwickelten ELISA (**C**) sowie einem IFT wurden alle Tiere (n=337) auf Antikörper (IgG) gegen *B. burgdorferi* s.l. getestet. Zusätzlich erfolgte die Gewinnung von Probenmaterial (Haut, Liquor, Synovia, Vollblut) von LB-verdächtigen Pferden, das für den direkten Erregernachweis (kulturelle Anzucht, PCR) zur Verfügung stand.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der ELISA wurden im Western Blot (Labor ALOMED²) hochpositive Seren der ELISA **A**, **B**, und **C** (je n=5), in allen Tests negative Seren (n=3) sowie die beiden Positivkontrollen der kommerziellen ELISA (**A** und **B**) untersucht. Die Positivkontrolle des ELISA **C** entsprach einer der hochpositiven Serumproben der ELISA. Mit Hilfe eines weiteren ELISA (LGL³) erfolgte die Detektion von IgA-, IgM- und IgG-AK in Liquorproben (n=15) sowie von IgM- und IgG-AK in den dazugehörigen Seren (n=15).

Die kulturelle Anzucht und die PCR wurden für den direkten Erregernachweis verwendet. Die Kultivierung von Haut- (n=16), Liquor- (n=15) und Synoviaprobe(n) (n=26) erfolgte in nativen sowie mit verschiedenen Hemmstoffen versetzten BSK- und MKP-Medien bei 33°C über 3 Monate. Die Kulturen wurden 1x wöchentlich subkultiviert und auf Borrelien mittels Dunkelfeldmikroskopie untersucht. In Haut- (n=14), Liquor- (n=15), Synovia- (n=26) und Vollblutproben (n=19) erfolgte der Nachweis von *B. burgdorferi* s.l.-DNA mit Hilfe der OspA-

¹ Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, seit dem 01.11.2002 Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

² Analytisches Labor (Radolfzell-Böhringen)

³ Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (Oberschleißheim)

spezifischen nested-PCR. Zur Überprüfung der Spezifität der positiven PCR-Ergebnisse wurde vom Labor ALOMED eine PCR mit Hilfe des LightCyclers durchgeführt.

Die Ergebnisse der serologischen Tests lassen eine hohe Diskrepanz innerhalb der Seroreagenten erkennen. So detektierten der ELISA **A** 61,1%, der ELISA **B** 9,8% und der ELISA **C** 3,3% der Pferde als seropositiv (n=337). Mit dem IFT (Grenztiter 1:128) konnten 33,2% der Seren positiv bewertet werden. Eine Übereinstimmung der serologischen Testergebnisse lag bei 74 Tieren (22,0%) vor. Davon zeigten 68 Pferde (20,2%) ein negatives und 6 (1,8%) ein positives Resultat. Ein Unterschied der Seropositivität zwischen klinisch unauffälligen (Gruppe A) und auffälligen Tieren (Gruppe B) war nicht zu erkennen. Darüber hinaus konnte kein Zusammenhang zwischen Antikörpertitern und verdächtigen LB-Symptomen beobachtet werden.

Im Western Blot wurden alle positiven (n=15) und negativen (n=3) Seren bestätigt, die Positivkontrolle der zwei kommerziell erhältlichen ELISA **A** und **B** jedoch nicht. Der LGL-ELISA wies bei den unterschiedlichen Serumverdünnungen: (1:50 = Verdünnung ELISA **A**) 53,3%, (1:200 = Verdünnung ELISA **C**) 26,7% und (1:400 = Verdünnung ELISA **B**) 6,7% seropositive Reagenten auf. Eine qualitative Übereinstimmung lag mit dem ELISA **A** vor.

Die kulturelle Anzucht von *B. burgdorferi* s.l. aus dem Probenmaterial (n=57) verlief in allen Fällen negativ. In einer Hautprobe wurden unbewegliche, spirochätenähnliche Gebilde beobachtet, bei denen es sich möglicherweise um Flagellenzöpfe der Begleitkeime handelt. Der spezifische DNA-Nachweis mit Hilfe der nested-PCR gelang in drei Haut- (3/16), zwei Liquor- (2/15), sechs Synovia- (6/26) und einer Vollblutprobe (1/19). Die Realtime-PCR konnte keine *B. burgdorferi* s.l.-DNA in diesen Proben nachweisen. Eine Übereinstimmung zwischen dem Nachweis von spezifischer Borrelien-DNA und Seropositivität wurde nicht registriert.

Diese widersprüchlichen Resultate implizieren die Dringlichkeit der Evaluierung direkter und indirekter Nachweisverfahren von *B. burgdorferi* s.l. in der Labordiagnostik. Ohne standardisierte Methodik (Antigenbeschichtung, Serumverdünnung, Positivkontrolle) der serodiagnostischen Tests sind die erforderlichen Ansprüche an die Sensitivität und Spezifität nicht erfüllt. Nur unter der Voraussetzung einer zuverlässigen Methode sind serologische Verlaufsuntersuchungen sinnvoll, die bei charakteristischer Titerdynamik und Vorliegen klinischer Zeichen auf die Verdachtsdiagnose LB hinweisen.

Aufgrund der fehlenden Standardisierung der PCR und der hohen Ansprüche des Erregers an Wachstum und Milieu bei der kulturellen Anzucht sind direkte Nachweisverfahren für die Routinediagnostik derzeit nicht geeignet.