

## 4. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Bedeutung des Rotfuchses in der Epidemiologie der Lyme-Borreliose am Beispiel ausgewählter Landkreise in Ostbrandenburg zu untersuchen. Aufgrund des hohen Anpassungs- und Reproduktionsvermögens dieser Tierart ist oftmals ein gemeinsamer Lebensraum von Mensch, Haustier (Hund, Katze) und Fuchs gegeben. Untereinander kann es entweder durch direkten Kontakt, wie z.B. bei der Tollwut (SCHÖFFEL et al., 1991), oder durch Vektoren, z.B. durch Zecken, zur Übertragung von Zoonosen kommen.

Bisher ist allerdings ungeklärt, ob der Rotfuchs tatsächlich Reservoirkompetenz für *B. burgdorferi* besitzt, d.h. inwieweit einerseits die Schildzecke den Fuchs beim Saugakt mit Borrelien infizieren kann und andererseits sich diese Erreger im Wirt vermehren.

Als Grundlage dieser Studie dienten die Ergebnisse vorangegangener parasitologischer Untersuchungen im Bundesland Brandenburg, die kurz dargestellt werden:

GUPTA et al. (1995) sammelten mit Hilfe der Fahnenmethode an 75 verschiedenen Standorten Schildzecken, die als *I. ricinus* bestimmt wurden. Die Infektionsrate der Zecken mit *B. burgdorferi* betrug mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie 16,7 %, der Kultivierung 22,8 % und des Immunfluoreszenztestes 23,9 %. Auffällig war, dass in 38,7 % der untersuchten Gebiete Borrelien gefunden wurden. Aus epidemiologischer Sicht liegt hier eine bemerkenswerte Größenordnung vor, die das in dieser Region nicht seltene Auftreten von Lyme-Borreliose beim Menschen erklären hilft. Mit der Einführung der Meldepflicht für alle klinischen Manifestationen durch den behandelnden Arzt und der Labormeldepflicht für positive Befunde der Lyme-Borreliose im Land Brandenburg war die Möglichkeit gegeben, flächendeckende Informationen über diese Krankheit zu erhalten. Hier zeigte sich, dass die Landkreise Barnim, Märkisch-Oderland, Uckermark und Oder-Spree die höchsten Erkrankungs-raten seit Beginn der Erfassung 1994 aufwiesen. Dieser deutliche Trend zu höheren Inzidenzen im Osten Brandenburgs ist u.a. auf die Dichte der für Zecken günstigen Biotope zurückzuführen (TALASKA, 1998b). Hierbei stellen prädisponierte Berufsschichten (Forstarbeiter, Jäger) eine besondere Risikogruppe für *B. burgdorferi*-induzierte Erkrankungen dar, wie eine Seroprävalenzstudie zum Vorkommen der Lyme-Borreliose bei 630 Waldarbeiterinnen und -arbeitern in Brandenburg zeigte (RATH et al., 1996). Im Vergleich zur nicht exponierten

Kontrollgruppe wiesen die Probanden häufiger AK gegen *B. burgdorferi* auf. Die Ergebnisse korrelierten mit dem Alter, der Beschäftigungsdauer, der Häufigkeit von Zeckenstichen und Erythemen.

Da alle Füchse in der vorliegenden Arbeit aus typischen Zeckengebieten Ostbrandenburgs stammten, konnte grundsätzlich von einer hohen Exposition dieser Tiere gegenüber einer *B. burgdorferi*-Infektion ausgegangen werden. Ein wichtiger Anhaltspunkt dafür war die Tatsache, dass 78 % der Füchse mehr oder weniger stark mit Zecken befallen waren. Die Ergebnisse zur Befallshäufigkeit mit *I. hexagonus* (6,6 %) und *I. canisuga* (0,8 %) bestätigen die Aussage, dass *I. ricinus* (92,6 %) die am häufigsten vorkommende Zeckenspezies in ländlichen Regionen Brandenburgs ist (CORNELY und SCHULTZ, 1992; MATUSCHKA et al., 1992; GUPTA et al., 1994). Im Vergleich dazu konnte bei Untersuchungen zur Parasitenbürde des Rotfuchses für den Berliner Raum eine Befallsintensität von 30 % mit *I. hexagonus*, 25 % mit *I. canisuga* bzw. 45 % mit *I. ricinus* (SCHÖFFEL et al., 1991) und in Mitteldeutschland (Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Thüringen) ein entsprechender Befall von 46,7 %, 29,0 % bzw. 24,3 % (LIEBISCH et al., 1996) erhoben werden.

#### **4.1. Untersuchung der Hautproben auf *B. burgdorferi* mittels Kultivierung und PCR**

Im Vorversuch konnte festgestellt werden, dass sich Begleitkeime sehr schnell vermehren und damit das Wachstum von Borrelien negativ beeinflussen. Infolgedessen war es notwendig, die Kulturmedien mit verschiedenen Antibiotika zu versetzen, wodurch die Isolierungsrate von *B. burgdorferi* aus Zecken erhöht werden kann (JOHNSON et al., 1984c; SCHÖNBERG et al., 1992; WITTENBRINK et al., 1994). In der vorliegenden Untersuchung erwies sich die Kombination von vier Hemmstoffen (Rifampicin + Polymyxin B + Amphotericin B + Bactrim) als die effektivste. Zudem war das Anlegen von Subkulturen unerlässlich, um unerwünschte bakterielle Kontaminationen so gering wie möglich zu halten.

Obleich über einen Zeitraum von 8 Wochen die angelegten Hautkulturen wöchentlich auf das Vorhandensein von Spirochäten untersucht wurden, konnte

weder im MKP (modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic)- noch im BSK II (Barbour-Stoener-Kelly)- Medium Borrelien nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Untersuchungen von LIEBISCH et al. (1996), die bei frisch erlegten Füchsen aus 100 in BSK- Medium kultivierten Hautbiopsien 27 Borrelien-Stämme isolierten und mit Hilfe der PCR als *B. garinii* identifizierten.

Als Grund für diese unterschiedlichen Kultivierungsergebnisse kann zum einen die geringe Tenazität des Erregers und zum anderen der hohe Nährstoffanspruch von Borrelien vermutet werden. KREIS (1996) konnte in diesem Zusammenhang nachweisen, dass die Lagerungsdauer von der Probenentnahme bis zum Kultivierungsbeginn eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Da im eigenen Versuch die Tiere größtenteils aber erst 1 bis 3 Tage nach dem Erlegen untersucht werden konnten, ist nicht auszuschließen, dass diese Zeitspanne einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Borrelien hatte. Für diese Annahme spricht auch der positive PCR-Nachweis in 7 von 100 untersuchten Hautproben.

Darüber hinaus wurden in den eigenen Untersuchungen bei 26 von 100 Füchsen mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie unbewegliche, spirochätenähnliche Gebilde in beiden Kulturmedien gefunden. Unter dem Elektronenmikroskop konnten diese Partikel jedoch eindeutig als Flagellenbündel der Begleitflora identifiziert werden, die in der Borrelien-spezifischen PCR negativ reagierten. Diese Resultate decken sich mit Angaben aus der Literatur. So konnten SCHÖNBERG et al. (1994) und BREM et al. (1999a) solche starren spiralförmigen Produkte während der Kultivierung von *Bacillus larvae* (jetzt *Paenibacillus larvae*), dem Erreger der bösartigen Faulbrut der Honigbiene, im BSK II-Medium feststellen. Vergleichbare Beobachtungen wurden bei der Kultivierung von Zeckenorganen in Australien gemacht (RUSSELL et al., 1994), wo in den ebenfalls mit Bazillen kontaminierten BSK II-Medien spirochätenähnliche Gebilde (SLO= engl.: spirochaete-like objects) im Dunkelfeldmikroskop dargestellt wurden. Auch in diesem Fall war es nicht möglich, Borrelien anzuzüchten bzw. die SLO in Subkulturen zu vermehren. Der Nachweis von Borrelien-DNS mittels einer spezifischen PCR verlief auch negativ. Allerdings konnte beim Einsatz von Primern für Eubakterien in allen Kulturen Bazillus-spezifische DNS amplifiziert werden. Unter dem Dunkelfeldmikroskop erschienen die SLO gerade, unbeweglich und unregelmäßig gewunden. Elektronenmikroskopisch ließen sich keine deutlichen zellulären Strukturen sondern vielmehr Gebilde mit einem faserähnlichen Aufbau

darstellen. In anderen Untersuchungen wurden spirochätenartige Isolate aus Hundeurinproben einer näheren Charakterisierung mittels Elektronenmikroskop unterzogen, wobei sich ebenfalls Faserbündel ohne eindeutige Zellstrukturen erkennen ließen (KREIS, 1996).

Aufgrund der Resultate in der PCR und der mikroskopischen Erkenntnisse müssen diese spirochätenähnlichen Gebilde daher als Artefakte angesprochen werden, deren Ursprung wahrscheinlich Aneinanderlagerungen von Bakterienflagellen waren.

Zu einer völlig anderen Auffassung hinsichtlich der Bedeutung dieser SLO gelangen allerdings PREAC-MURSIC et al. (1996). Deren Gebilde, die aus einer mit *Bacillus* sp. kontaminierten Hautbiopsie stammten, wechselten nach 4 Subkulturen im MKP-Medium von der unbeweglichen in die helikale bewegliche Form. Dieses Phänomen ist aufgrund der vorliegenden Befunde nur derart erklärbar, dass Borrelien anfänglich in sehr geringer Keimzahl vorhanden waren und sich erst nach mehreren Subkultivierungen darstellen ließen. Bei den starren Formen handelte es sich möglicherweise um parallel auftretende, unspezifische Flagellenbündel von Kontaminationskeimen.

In den eigenen Untersuchungen wurden unter den Begleitkeimen auch Corynebakterien (*Corynebacterium aquaticum*) bestimmt (BREM et al., 1999b), die als wesentliche Ursache für die spirochätenartigen Gebilde anzusehen sind (HEIDRICH et al., 1999). Es handelt sich dabei um die Geißeln der Begleitkeime, die sog. "Geißelzöpfe" bilden und für unbewegliche, spiralförmige Organismen gehalten bzw. irrtümlicherweise als Borrelien angesprochen werden können. Um falsch-positive Kultivierungsergebnisse auszuschließen, ist es daher ratsam, unbewegliche, spiralige Gebilde wiederholt mittels geeigneter Nachweismethoden (z.B. PCR, Elektronenmikroskopie) näher zu differenzieren.

Die Hautproben wurden darüber hinaus auch mit Hilfe der PCR untersucht. Dieses Verfahren wird in jüngerer Zeit wegen der hohen Empfindlichkeit, ihrer verhältnismäßig langen Generationsdauer und der oft geringen Keimzahl im Wirtsgewebe als bevorzugte Labormethode in der Diagnostik der Borreliose angesehen (HUNFELD et al., 1998). So konnte in 7 % der untersuchten Hautproben der Rotfuchse *B. burgdorferi* s.l. nachgewiesen werden. Dieses spricht für einen

Kontakt mit Borrelien-infizierten Zecken, lässt jedoch keinen Rückschluss auf die Lebens- und Vermehrungsfähigkeit des Erregers im Wirtsorganismus zu. Offenbar handelte es sich in allen Fällen um DNS von Borrelien, die mit dem Stich der Zecke in den Körper des Rotfuchses gelangten, sich aber im Gewebe nicht mehr nennenswert vermehren konnten. Dieses würde erklären, warum mit Hilfe der Kultivierung keine Borrelien isoliert werden konnten und keine der Fuchsseren spezifische Anti-*Borrelia*-IgG enthielten. Auch in der Humanmedizin sind Fälle von positivem PCR-Ergebnis und fehlendem serologischen bzw. kulturellem Nachweis bekannt. SCHEMPP et al. (1993) und TREVISAN et al. (1997) konnten aus Hautbiopsien von Patienten mittels der PCR spezifische Borrelien-DNS nachweisen, obgleich die Untersuchungen im ELISA und Western-Blot sowie die Kultivierung negativ verliefen. Die Autoren schließen aus den Befunden, dass bei negativer Borrelien-Serologie einerseits eine Erregerpersistenz und andererseits eine spezifische zelluläre Immunreaktion vorliegen kann.

Die eigenen Untersuchungsergebnisse zeigen, dass die PCR in der Diagnostik der Hautborreliose der Kultivierung überlegen ist und bestätigen damit die Aussage von MOTER et al. (1994). Als Gründe kommen eine höhere Sensitivität der nested-PCR im Vergleich zur Dunkelfeldmikroskopie von Kulturmedien, das fehlende Wachstum von beweglichen Spirochäten in der Kultur bzw. die Anwesenheit von unbeweglichen, spiralförmigen Gebilden in Betracht. Es konnte bei der Untersuchung von Borrelien-infizierten Patienten mit klinischen Hautveränderungen (Erythema migrans, Acrodermatitis chronica atrophicans) festgestellt werden, dass die positiven Ergebnisse bei der PCR (19 von 22) höher waren als bei der Kultivierung (3 von 22). Entsprechende Resultate verzeichnete auch KREIS (1996) beim Nachweis von *B. burgdorferi* im Urin von Hunden. Spirochäten wurden kulturell in keiner Urinprobe festgestellt. Demgegenüber konnte mittels der nested-PCR in 32 Fällen (14,8 %) spezifische DNS amplifiziert werden. Das Anzuchtverfahren erwies sich aufgrund von Störungen durch inhibitorische Faktoren (Begleitkeime) erheblich anfälliger als die PCR.

#### 4.2. Serologische Untersuchungen zum AK-Nachweis mittels ELISA

Die Methoden zum direkten Erregernachweis beim Fuchs (Kultivierung, PCR) wurden durch den ELISA als indirekte Methode zum Nachweis spezifischer *Borrelia*-AK (IgG) ergänzt. Die Vollblutseren aller Rotfüchse waren sowohl im Viramed®-Testkit als auch im laboreigenen ELISA-Test seronegativ.

In der Literatur finden sich Ergebnisse zu Seroprävalenzstudien beim Rotfuchs, bei denen unterschiedliche Untersuchungsmethoden zur Anwendung kamen und die sich von den eigenen Resultaten deutlich unterscheiden. So untersuchte GEUE (1993) mittels ELISA 2960 Fuchsseren aus dem Bundesland Brandenburg auf Antikörper gegen *B. burgdorferi* s.l.. Die Anzahl seropositiver Füchse in den Jahren 1992 und 1993 lag insgesamt jeweils bei 22 %. Im Western-Blot konnte jedoch nur etwas mehr als ein Viertel der ELISA-Ergebnisse bestätigt werden. Ähnliche Resultate ermittelten auch SCHÖFFEL et al. (1991). Von 98 untersuchten Fuchsseren aus Berlin reagierten 16,3 % der Tiere im ELISA mit deutlich positiven IgG-AK-Titern über 1:256, während 20 Serumproben in der Titerstufe 1:128 eine fragliche Reaktion zeigten.

Im passiven Hämagglutinationstest stellten DOBY et al. (1991a) bei Untersuchungen in Frankreich fest, dass 12,8 % der jungen und 42,9 % der älteren Füchse seropositiv waren. In der Slowakei dagegen waren 5 mit dieser Methode untersuchten Füchse seronegativ (NADZAMOVA et al., 1999). Mittels des IFT wurden bei Untersuchungen in den USA bei 7 von 93 Rotfüchsen (8 %) AK-Titer  $\geq$  1:64 ermittelt (KAZMIERCZAK and BURGESS, 1989).

Ebenfalls mit Hilfe des IFT führte KOPP (1990) Untersuchungen zum Titerverlauf von Anti-*Borrelia*-IgG bei experimentell mit Borrelien infizierten Hunden (15 Mill. Borrelien/kg KGW) durch, wobei die Titerstufen wöchentlich über insgesamt 49 Wochen kontrolliert wurden. Aus den Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass nach der Serokonversion 2 Wochen p.i. eine seropositive Reaktion lediglich bis zur 12. Woche p.i., d.h. über einen Gesamtzeitraum von nur 10 Wochen, nachweisbar war. Zu ähnlichen Resultaten mit dem IFT gelangten BURGESS (1986) und GREENE et al. (1988), die nach experimenteller Infektion von Hunden von der 4. Woche p.i. bis etwa zur 10. Woche p.i., d.h. über einen Gesamtzeitraum von nur 6 Wochen, spezifische Antikörper nachweisen konnten. Vergleichbare Untersuchungsergebnisse konnten auch CERRI et al. (1994) bei einem experimentell

infizierten Hund mittels IFT ermitteln. Danach wurde ein Titer von 1:64 (IgG-AK) 4 Wochen p.i. ermittelt, der sein Maximum von 1:256 in der 7. Woche p.i. erreichte, dann abfiel und von der 9. bis zur 11. Woche p.i. wieder 1:64 betrug. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass nach der Serokonversion und dem Erreichen des Titermaximums ein relativ schneller Abfall des AK-Titers erfolgt, der nach dem Unterschreiten des Cut-off zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Dieser Umstand würde die Ergebnisse von ISOGAI et al. (1994) in Japan erklären, bei denen der IgG-AK-Nachweis mittels ELISA negativ verlief, obgleich kulturell in Haut-, Gehirn-, Herz-, Nieren- und Leberproben eines Fuchses Spirochäten nachgewiesen werden konnten.

Die Dynamik der Antikörperspiegel ist bei experimentell infizierten Tieren wesentlich deutlicher ausgeprägt. Insofern ist auch ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Felduntersuchung nur bedingt möglich. Aufgrund der ausschließlich seronegativen Ergebnisse (Anti-*Borrelia*-IgG) einerseits und der erfolglosen Kultivierung von *B. burgdorferi* aus Hautproben andererseits kann angenommen werden, dass sofern Borrelien mit dem Zeckenstich in die Haut des Fuchses gelangten, eine Spirochätämie und Stimulierung des humoralen Immunsystems nicht stattgefunden hat. Eine weitere Erklärung dafür wäre, dass die Erregerabwehr ohne die Bildung von diagnostisch relevanten Antikörpermengen einhergeht (GOEBEL, 1995). Die Autorin hält in diesem Zusammenhang eine entscheidende Beteiligung der zellulären Immunantwort für möglich.

Ferner kann aufgrund der Qualität des Fuchsblutes nicht in jedem Fall eine zu geringe Sensitivität des ELISA ausgeschlossen werden.

Nicht zuletzt muss aber auch eine bakteriostatische bzw. bakteriozide Wirkung des Tetrazyklins bei den Füchsen, die Tollwutköder aufgenommen hatten, in Betracht gezogen werden. Im Mai 1996 wurden im Bundesland Brandenburg die Wälder aus der Luft beködert. Der Köder enthielt neben dem Tollwutimpfstoff zusätzlich als Markersubstanz 150 mg Tetrazyklin, welches aufgrund seiner Persistenz im Knochengewebe lange nachweisbar ist. Im Rahmen der Tollwutdiagnostik wurden die Kieferknochen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der positive Tetrazyklinnachweis bei 72 % der untersuchten Tiere bewies, dass es in der Mehrzahl der Fälle zur Aufnahme eines oder mehrerer Köder in der Population kam.

### **4.3. Untersuchung der Zecken auf *B. burgdorferi* mittels indirektem IFT und PCR**

Um das Expositionsrisiko für Füchse mit Borrelien besser beurteilen zu können, war es notwendig, die Infektionsrate der von den Füchsen abgesammelten Zecken zu ermitteln. Zu diesem Zweck wird bevorzugt der indirekte Immunfluoreszenztest eingesetzt. In Bezug auf die Befallshäufigkeit der untersuchten Zecken sind in der Literatur jedoch erhebliche Unterschiede zu verzeichnen (Tab. 1). Beispielsweise konnten KAHL et al. (1989) im Berliner Raum lediglich eine Befallsrate von 8,2 % ermitteln, während GUPTA (1994) in verschiedenen angrenzenden Landkreisen Brandenburgs bis zu 33,3 % positive Zecken nachweisen konnte. Als Ursache für derartige Unterschiede dürften neben einer gewissen regionalen Häufung von Borrelien-infizierten Zecken auch andere methodenbedingte Faktoren, wie die im IFT verwendeten Konjugate, verantwortlich sein. So ermittelten FINGERLE et al. (1995) bei der Untersuchung von 168 weiblichen *I. ricinus* aus der Umgebung von München mit dem IFT unter Verwendung von polyklonalen AK eine Prävalenz von 20,2 %, die sich bei der Verwendung von monoklonalen AK auf 17,9 % verringerte. Aus diesem Grund wurde in den eigenen Untersuchungen zum Nachweis von *B. burgdorferi* in Zecken sowohl mit poly- als auch mit monoklonalen Antikörpern gearbeitet. In Einklang zu den Ergebnissen von FINGERLE et al. (1995) konnte unter Verwendung polyklonaler AK eine Prävalenz von 45 % ermittelt werden. Die mit Hilfe monoklonaler AK nachgewiesene Befallsrate von 18 % liegt, verglichen mit anderen Infektionsraten Europas, hingegen im durchschnittlichen Erwartungsbereich für Deutschland. Die Ursache für die stark differierenden Ergebnisse dürfte in der weitaus höheren Spezifität monoklonaler AK begründet liegen. So betonten WILSKE and PREAC-MURSIC (1993), dass monoklonale AK nur an bestimmte Antigen determinanten binden, während polyklonale AK sehr viele unspezifische Epitope erkennen. Um möglichst viele falsch-positive Ergebnisse beim Einsatz von polyklonalen AK im IFT auszuschließen, wird daher empfohlen, ein Befund erst dann als positiv zu bewerten, wenn der Nachweis mehrerer spiraliger Formen möglich ist. Prinzipiell muss betont werden, dass der IFT zwar methodisch einfach ist, jedoch fundierte Erfahrungen, insbesondere in der Beurteilung schwacher Fluoreszenzbilder, notwendig sind. Insofern können die Ergebnisse einen sehr subjektiven Charakter haben (PORSTMANN, 1998). Des Weiteren bereiten Kreuzreaktionen mit



verschiedenen anderen Erregern aufgrund der weitgehenden Homologie der Flagellen wesentliche Probleme bei der Auswertung des IFT (TALASKA, 1998a).

Aus den genannten Gründen wurde über die Untersuchung mit dem indirekten IFT hinaus die Infektionsrate der Zecken mit *B. burgdorferi* zusätzlich auch mit Hilfe der PCR ermittelt. Die Ergebnisse der eigenen Vorversuche haben allerdings gezeigt, dass ein hohes Maß an Sensitivität erst durch den Einsatz einer sogenannten „nested-PCR“ gewährleistet wird. Mit dieser Modifikation kann zusätzlich auch die Spezifität gesteigert werden. Das Wesen der nested-PCR besteht darin, mit dem zuvor erhaltenen PCR-Produkt eine weitere PCR durchzuführen. Dabei kommen Primer zum Einsatz, deren Erkennungssequenzen sich innerhalb des vorher amplifizierten Genabschnittes befinden. Auf diese Weise entsteht eine hohe Anzahl von DNS-Kopien der Zielsequenz (HUNFELD et al., 1998).

In den eigenen Untersuchungen erwies sich die 2-Phasen-(nested)-PCR mit einer Nachweisgrenze von 1 fg Borrelien-DNS (etwa 1 Borrelienzelle) um mindestens eine Zehnerpotenz der 1-Phasen-PCR überlegen.

Im Vergleich der für verschiedene Regionen Deutschlands ermittelten Prävalenzen von 8,2 % bis 34,7 % (Tab. 1) wurde in den eigenen Untersuchungen eine Infektionsrate von 19 % mittels PCR festgestellt. Auch in diesem Fall muss jedoch berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Methoden Anwendung fanden und dadurch ebenfalls Unterschiede in der Sensitivität zu verzeichnen sind.

Die Ergebnisse im IFT und der PCR (Tab. 13) waren teilweise voneinander abweichend. Insgesamt reagierten 6 der 100 untersuchten Zecken in allen drei Untersuchungsmethoden (IFT/polyklonale AK, IFT/monoklonale AK und PCR) *Borrelia*-positiv. Gegenüber der PCR wies der IFT eine höhere Befallsextenstität der Zecken mit *B. burgdorferi* auf, was auch in vergleichenden Untersuchungen von KAHL et al. (1998) festgestellt werden konnte. Diese Autoren ermittelten eine Infektionsrate von 46,4 % im IFT und von lediglich 27 % in der PCR. Im Gegensatz dazu war bei Zeckenuntersuchungen im Freistaat Sachsen der Anteil positiver Ergebnisse bei der PCR im Vergleich zum IFT höher (BIGL et al., 1999). In dieser Untersuchung wurden insgesamt 3234 Zecken aus den sächsischen sowie angrenzenden Gebieten gesammelt und diese mittels IFT und nested-PCR untersucht. Die Prävalenzraten lagen im IFT bei 18,42 % (erste Fangperiode) bzw. bei 32,56 % (zweite Fangperiode) und in der nested-PCR bei 23,96 % bzw. 40,00 %.

Die Gründe für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse dürften vielschichtiger Natur sein. So konnte bei einem Methodenvergleich zwischen verschiedenen europäischen Arbeitsgruppen festgestellt werden, dass entweder der IFT zu falsch-positiven Resultaten neigt und/oder die PCR nicht alle positiven Infektionen erkennt (KAHL et al., 1998). Der IFT ist allerdings preiswerter, seine Durchführung weniger anspruchsvoll, und außer einem Fluoreszenzmikroskop ist keine spezielle Laborausstattung notwendig. Ferner erfasst der IFT nur Zellen, die während der Fixierung intakt vorlagen, während die PCR die Ziel-DNS nachweist, egal ob die Organismen während der Probenvorbereitung zerstört waren oder nicht. Auf die PCR können viele Faktoren aber auch einen hemmenden Einfluss ausüben (WILSON, 1997). So stellt u.a. die Kontamination ein großes Problem dar, welche endogen (unzureichend gereinigte Ziel-DNS, Enzyme, Gebrauch unterschiedlicher Reaktionsgefäße) oder exogen (Bakterien, Staub, Pollen) erfolgen kann. Um diesen Einflussfaktoren weitestgehend vorzubeugen, wurden in den eigenen Untersuchungen aerosolgeschützte Pipettenspitzen mit Sicherheitsfiltern und Einmalhandschuhe verwendet sowie die Probenaufbereitung, der PCR-Ansatz (Werkbank mit UV-Licht), die Amplifikation und Gelelektrophorese strikt räumlich voneinander getrennt. Ferner wurden zur besseren Abklärung von evtl. negativen Effekten durch Inhibitoren parallel Positivkontrollen mitgeführt bzw. Negativkontrollen zur Erkennung von möglichen Kontaminationen durch Verschleppung von DNS-Aerosolen („carry over“) eingesetzt. Des weiteren haben die Reaktionsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg und die Spezifität der DNS-Neusynthese. So sind insbesondere die Primer, das Temperaturprofil (vor allem die Primerbindungstemperatur), die  $MgCl_2$ -Konzentration sowie die Qualität der Polymerase wichtige Faktoren für eine aussagekräftige PCR (ROLFS et al., 1992; ABU AL-SOUD and RADSTRÖM, 1998). Zudem ist bekannt, dass einige Substanzen im Blut (wie z.B. Hämoglobin, Heparin und Porphyrinabkömmlinge) die PCR negativ beeinflussen können (KAUFMAN et al., 1993; SCHWARTZ et al., 1997).

##### Schlussfolgerungen:

Aus den eigenen Untersuchungsergebnissen und dem Vergleich der angewandten Labormethoden lassen sich folgende Schlussfolgerungen ableiten:

- 78% der untersuchten Füchse waren mit den für dieses Gebiet bekannten Zeckenarten *I. ricinus*, *I. hexagonus* und *I. canisuga* befallen.
- Nach den Ergebnissen des indirekten IFT und der PCR stammten die Zecken aus einem typisch mit Borrelien exponierten Gebiet. Unter Verwendung monoklonaler Antikörper konnte im IFT eine höhere Spezifität gegenüber dem Einsatz polyklonaler Antikörper erreicht werden.
- Die Rotfüchse waren gegenüber einer Infektion mit *B. burgdorferi* exponiert. Dafür spricht neben dem Befall mit den Borrelien-infizierten Zecken auch die Tatsache, dass mit Hilfe der nested-PCR in 7% der Hautproben Borrelien-DNS nachgewiesen wurde.
- Zur Kultivierung von *B. burgdorferi* erwiesen sich das MKP- und BSK II-Medium unter Zusatz von Rifampicin, Polymyxin B, Amphotericin B und Bactrim als gut geeignet. Da jedoch weder die Kultivierung von Borrelien aus den Hautproben der Füchse noch der Nachweis von spezifischen Antikörpern in den entsprechenden Blutproben mit dem ELISA möglich waren, verfügt der Rotfuchs vermutlich über keine bzw. nur eine geringe Reservoirkompetenz.
- Der kulturelle Nachweis unbeweglicher, spirochätenähnlicher Gebilde in 26% der Fälle, die sich mit Hilfe der Elektronenmikroskopie als Flagellenbündel der Begleitflora erwiesen und in der Borrelien-spezifischen PCR negativ reagierten, unterstreicht die Notwendigkeit einer differenzierten Abklärung zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse.