

8. ANHANG

MEDIEN ZUR ANZÜCHTUNG VON *B. BURGENDORFERI*

BSK II -Medium:

(modifiziert nach SCHÖNBERG et al., 1988)

- 1.0 100 ml CMRL 1066, 10x konzentriert, ohne Glutamin und Natriumcarbonat, Fa. Gibco, Best.Nr. 042-01540 H
- 2.0 Zugabe von 900 ml A. bidest. (vorher autoklavieren)
- 3.0 Ergänzung des Mediums mit:
 - 3.1 5,0 g Neopeptone, Fa. Difco, Best.Nr. 0119-02
 - 3.2 50,0 g Rinderalbumin, Fraktion V, Fa. Miles, Best.Nr. 81-003
 - 3.3 2,0 g Yeastolate, Fa. Difco, Best.Nr. 5577-15-6
 - 3.4 6,0 g Hepes
 - 3.5 5,0 g Glukose
 - 3.6 0,7 g Natriumcitrat
 - 3.7 0,8 g Natriumpyruvat
 - 3.8 0,4 g N-acetylglucosamine, Fa. Sigma, Best.Nr. A 8625
 - 3.9 2,2 g Natriumcarbonat
- 4.0 pH-Wert bei Zimmertemperatur mit 1N NaOH auf 7,6 einstellen
- 5.0 Zugabe von 200 ml 7 %iger Gelatine
- 6.0 Zugabe von Kaninchenserum bis zur Endkonzentration von 6 %, Fa. Gibco, Best.Nr. 037-06120
- 7.0 Medium ins Wasserbad (1 Stunde bei 37°C und ½ Stunde bei 45°C), danach filtrieren (Filtrationsgerät mit Vorfilter benutzen)
- 8.0 Abfüllen und Sterilitätsprüfung, Aufbewahrung im Kühlschrank, bei längeren Aufbewahrungszeiten Medium einfrieren und vor Verwendung Filtration wiederholen

MKP-Medium:

(modifiziertes Kelly-Medium nach PREAC-MURSIC et al., 1986)

- 1.0 100 ml CMRL-1066, ohne Glutamin (Fa. Gibco)
- 2.0 900 ml A. bidest.
- 3.0 Ergänzen mit:
 - 3.1 3,0 g Neopepton (Fa. Difco)
 - 3.2 6,0 g Hepes (Fa. Sigma)
 - 3.3 3,0 g Glukose (Fa. Sigma)
 - 3.4 0,7 g Natriumcitrat (Fa. Sigma)
 - 3.5 0,8 g Natriumpyruvat (Fa. Sigma)
 - 3.6 0,4 g N-acetylglucosamine (Fa. Sigma)
 - 3.7 2,0 g Natriumbicarbonat (Fa. Sigma)
- 4.0 pH-Wert mit 1 N NaOH auf 7,6 einstellen, steril filtrieren
- 5.0 Zugabe von 200 ml 7 %iger Gelatine (Fa. Merck, 15 min bei 115°C autoklaviert)
- 6.0 Zugabe von 70 ml Kaninchenserum-partial-hämolyziert (Fa. Gibco, 30 min bei 56°C inaktiviert)
- 7.0 Zugabe von 35 ml 35 %igem Rinderserumalbumin
- 8.0 Medium ins Wasserbad (1 Stunde bei 37°C und ½ Stunde bei 45°C), danach filtrieren (Filtrationsgerät mit Vorfilter benutzen)
- 9.0 Abfüllen und Sterilitätsprüfung, Aufbewahrung im Kühlschrank, bei längeren Aufbewahrungszeiten Medium einfrieren und vor Verwendung Filtration wiederholen

PUFFER FÜR IIFT

PBS:

NaCl (Fa. Merck)	0,14	M (8,000 g)
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	8,00	mM (2,900 g)
KH ₂ PO ₄ (Fa. Merck)	1,46	mM (0,200 g)
KCL (Fa. Merck)	2,68	mM (0,200 g)
steriles A. bidest.	ad	1000,00 ml

pH: 7,4

PBS/MgCl₂:

NaCl (Fa. Merck)	0,14	M (8,000 g)
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Fa. Merck)	8,00	mM (2,900 g)
KH ₂ PO ₄ (Fa. Merck)	1,46	mM (0,200 g)
KCL (Fa. Merck)	2,68	mM (0,200 g)
MgCl ₂ x 6 H ₂ O (Fa. Merck)	5,00	mM (1,065 g)
steriles A. bidest.	ad	1000,00 ml
pH: 7,4		

AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Kompositgel (Fa. Biozym):

3 g (4 %iges Gel) bzw. 1g (2 %iges Gel) Nusieve GTG (FMC 50082) und 1g Seakem GTG (FMC 50072) in 100 ml 1x Elektrophoresepuffer einrühren, in der Mikrowelle bei mittlerer Stärke für 1 min erwärmen und danach auf einem Magnetrührer rühren. Den Vorgang wiederholen bis es kocht. Anschließend das Gel in kleine Portionen (je 25ml) abfüllen, die nach dem Abkühlen bei 4° C gelagert werden.

10x Elektrophoresepuffer:

0,36 M TRIS	43,60	g/l
0,30 M NaH ₂ PO ₄ +H ₂ O	41,40	g/l
0,01 M EDTA	3,72	g/l
steriles A. bidest.	ad	1000,00 ml
pH: 8,0		
bei 4°C lagern		

Auftragspuffer:

0,05 % Bromphenolblau	0,005	g
50 % Glycerin	5,00	ml
100 mM EDTA	0,37	g
1x Elektrophoresepuffer	ad	5,00 ml
bei Raumtemperatur lagern		

100-bp DNS-Längenstandard (50 µg / 50 µl):

50 µl Längenstandard + 400 µl 1x Elektrophoresepuffer
+ 50 µl Auftragspuffer

in 100 µl Portionen aufteilen und bei -25°C lagern

SOUTHERN-BLOT-HYBRIDISIERUNG

Pufferhaltbarkeit: 3 Monate bei 2-8°C

20 x SSC:

Na₃citrate 0,3 M (88,23 g/l)

NaCl 3,0 M (175,33 g/l)

pH: 7,0

Primary-wash-Puffer mit Harnstoff:

Harnstoff 6 M (360 g)

SDS 0,4 % (4,0 g)

20 x SSC 0,5 x SSC (25 ml)

steriles A. bidest. ad 1000,00 ml

Secondary-wash-Puffer (2 x SSC):

20 x SSC 100 ml

steriles A. bidest. ad 1000,00 ml

Tab. 2: Herkunft, Alter und Geschlecht der Rotfuchse

FUCHS	LANDKREIS	ALT-/JUNGTIER	GESCHLECHT
1	MOL	A	weiblich
2	UM	A	männlich
3	MOL	A	männlich
4	LOS	A	weiblich
5	BAR	A	männlich
6	UM	A	weiblich
7	MOL	J	männlich
8	MOL	J	weiblich
9	UM	A	männlich
10	UM	A	männlich
11	UM	A	männlich
12	UM	A	männlich
13	BAR	A	männlich
14	BAR	A	weiblich
15	UM	A	männlich
16	MOL	A	weiblich
17	LOS	A	männlich
18	LOS	A	männlich
19	BAR	A	weiblich
20	BAR	A	weiblich
21	BAR	A	weiblich
22	MOL	J	weiblich
23	MOL	J	weiblich
24	MOL	A	männlich
25	BAR	A	männlich
26	BAR	A	männlich
27	LOS	A	männlich
28	UM	A	männlich
29	MOL	J	männlich
30	LOS	A	männlich
31	UM	A	weiblich
32	UM	A	männlich
33	BAR	J	männlich
34	MOL	A	männlich
35	LOS	A	weiblich
36	LOS	J	männlich
37	BAR	A	weiblich
38	LOS	J	männlich
39	LOS	A	weiblich
40	BAR	A	männlich
41	LOS	J	männlich
42	BAR	A	männlich
43	LOS	A	weiblich
44	UM	A	weiblich
45	LOS	A	weiblich
46	LOS	A	männlich
47	BAR	A	männlich
48	LOS	A	weiblich
49	BAR	A	männlich
50	UM	A	weiblich
51	MOL	A	weiblich
52	BAR	A	weiblich
53	LOS	A	weiblich

8. ANHANG

54	LOS	A	weiblich
55	BAR	A	männlich
56	UM	A	weiblich
57	UM	A	weiblich
58	MOL	A	weiblich
59	LOS	A	weiblich
60	LOS	A	männlich
61	MOL	A	männlich
62	BAR	A	männlich
63	MOL	A	männlich
64	MOL	A	weiblich
65	MOL	A	männlich
66	UM	A	weiblich
67	LOS	A	weiblich
68	LOS	A	männlich
69	BAR	A	männlich
70	UM	A	weiblich
71	UM	A	männlich
72	MOL	A	männlich
73	LOS	A	männlich
74	LOS	A	männlich
75	BAR	A	weiblich
76	UM	A	männlich
77	BAR	A	weiblich
78	MOL	A	männlich
79	BAR	A	weiblich
80	LOS	A	weiblich
81	BAR	A	männlich
82	UM	A	weiblich
83	MOL	A	weiblich
84	UM	A	männlich
85	BAR	A	männlich
86	LOS	A	männlich
87	LOS	A	männlich
88	MOL	A	weiblich
89	UM	A	weiblich
90	UM	A	männlich
91	UM	A	weiblich
92	MOL	A	männlich
93	LOS	A	männlich
94	LOS	A	männlich
95	UM	A	männlich
96	UM	A	weiblich
97	UM	A	männlich
98	LOS	A	männlich
99	LOS	A	männlich
100	LOS	A	männlich

BAR= Barnim

MOL= Märkisch-Oderland

LOS= Oder-Spree

UM = Uckermark

Tab. 10: Ergebnisse der Probenentnahme

FUCHS	HERKUNFT	ZECKEN	FLÖHE	TETRAZYKLIN-NACHWEIS	FLAGELLEN
1	MOL	6	0	positiv	negativ
2	UM	29	0	positiv	negativ
3	MOL	7	1	positiv	negativ
4	LOS	5	1	negativ	negativ
5	BAR	21	3	positiv	negativ
6	UM	0	>40	positiv	negativ
7	MOL	10	0	positiv	positiv
8	MOL	13	2	positiv	negativ
9	UM	14	0	positiv	negativ
10	UM	6	0	positiv	negativ
11	UM	19	3	positiv	negativ
12	UM	5	2	positiv	negativ
13	BAR	5	1	positiv	negativ
14	BAR	4	0	positiv	negativ
15	UM	4	8	negativ	negativ
16	MOL	12	0	positiv	positiv
17	LOS	0	0	positiv	negativ
18	LOS	7	0	positiv	negativ
19	BAR	6	0	positiv	positiv
20	BAR	7	0	positiv	negativ
21	BAR	5	1	positiv	positiv
22	MOL	11	2	negativ	negativ
23	MOL	13	5	positiv	negativ
24	MOL	0	0	positiv	negativ
25	BAR	8	1	positiv	negativ
26	BAR	3	11	positiv	negativ
27	LOS	1	2	positiv	negativ
28	UM	1	0	positiv	negativ
29	MOL	9	2	positiv	negativ
30	LOS	20	0	positiv	negativ
31	UM	18	1	positiv	positiv
32	UM	2	0	positiv	negativ
33	BAR	9	0	positiv	negativ
34	MOL	19	0	positiv	negativ
35	LOS	1	0	positiv	negativ
36	LOS	0	0	positiv	positiv
37	BAR	3	5	negativ	negativ
38	LOS	3	1	positiv	negativ
39	LOS	4	2	negativ	negativ
40	BAR	14	0	positiv	negativ
41	LOS	9	2	positiv	negativ
42	BAR	15	2	negativ	negativ
43	LOS	1	0	negativ	negativ
44	UM	2	0	positiv	negativ
45	LOS	0	0	positiv	negativ
46	LOS	8	0	positiv	positiv
47	BAR	24	0	positiv	negativ
48	LOS	6	0	negativ	negativ
49	BAR	10	2	positiv	positiv
50	UM	0	0	positiv	negativ
51	MOL	5	0	negativ	positiv
52	BAR	7	0	positiv	positiv

8. ANHANG

53	LOS	1	0	positiv	negativ
54	LOS	0	0	positiv	negativ
55	BAR	9	1	negativ	positiv
56	UM	3	3	negativ	negativ
57	UM	0	2	negativ	negativ
58	MOL	30	0	positiv	negativ
59	LOS	2	0	positiv	positiv
60	LOS	0	0	positiv	negativ
61	MOL	1	6	negativ	negativ
62	BAR	12	0	negativ	positiv
63	MOL	2	6	positiv	positiv
64	MOL	0	0	negativ	negativ
65	MOL	1	0	negativ	negativ
66	UM	2	8	positiv	negativ
67	LOS	4	1	negativ	negativ
68	LOS	1	0	negativ	negativ
69	BAR	5	5	positiv	negativ
70	UM	5	3	positiv	negativ
71	UM	4	0	negativ	negativ
72	MOL	4	3	positiv	negativ
73	LOS	6	0	positiv	negativ
74	LOS	25	1	positiv	positiv
75	BAR	13	2	positiv	negativ
76	UM	0	3	negativ	negativ
77	BAR	0	0	positiv	positiv
78	MOL	1	3	positiv	positiv
79	BAR	2	0	positiv	positiv
80	LOS	11	0	negativ	positiv
81	BAR	8	0	negativ	positiv
82	UM	0	0	positiv	positiv
83	MOL	0	2	negativ	positiv
84	UM	1	0	positiv	positiv
85	BAR	1	0	negativ	negativ
86	LOS	5	0	negativ	negativ
87	LOS	2	0	positiv	negativ
88	MOL	4	0	positiv	negativ
89	UM	0	0	positiv	positiv
90	UM	4	5	negativ	negativ
91	UM	1	0	positiv	negativ
92	MOL	0	15	positiv	negativ
93	LOS	0	9	positiv	negativ
94	LOS	0	2	negativ	negativ
95	UM	0	0	positiv	negativ
96	UM	0	0	positiv	negativ
97	UM	0	0	negativ	positiv
98	LOS	0	0	positiv	positiv
99	LOS	10	0	positiv	negativ
100	LOS	2	0	positiv	negativ

BAR= Barnim

MOL= Märkisch-Oderland

LOS= Oder-Spree

UM = Uckermark

Tab. 11: Untersuchungsergebnisse (IIFT, PCR) der 100 Zecken von 31 Rotfüchsen zum Vorkommen von *B. burgdorferi*

NR.	FUCHS	IIFT/polyklonale AK	IIFT/monoklonale AK	PCR
1	4	negativ	negativ	negativ
	4	negativ	negativ	negativ
	4	negativ	negativ	negativ
2	5	negativ	negativ	negativ
	5	positiv	negativ	negativ
	5	negativ	negativ	negativ
	5	negativ	negativ	negativ
	5	negativ	negativ	negativ
3	7	negativ	negativ	negativ
	7	positiv	positiv	negativ
4	8	negativ	negativ	negativ
	8	negativ	negativ	negativ
5	9	negativ	negativ	negativ
	9	negativ	negativ	negativ
	9	negativ	negativ	negativ
6	11	negativ	negativ	negativ
	11	negativ	negativ	negativ
	11	negativ	negativ	negativ
	11	negativ	negativ	negativ
	11	negativ	negativ	negativ
7	15	negativ	negativ	negativ
	15	negativ	negativ	negativ
8	16	negativ	negativ	negativ
	16	negativ	negativ	negativ
	16	negativ	negativ	negativ
9	22	negativ	negativ	negativ
	22	negativ	negativ	negativ
	22	negativ	negativ	negativ
	22	negativ	negativ	negativ
	22	negativ	negativ	negativ
	22	positiv	negativ	negativ
10	23	positiv	positiv	positiv
	23	negativ	negativ	negativ
11	30	positiv	negativ	negativ
	30	positiv	negativ	negativ
	30	positiv	positiv	negativ
	30	positiv	positiv	negativ
	30	positiv	negativ	positiv
	30	negativ	negativ	negativ
12	31	negativ	negativ	negativ
13	34	negativ	negativ	negativ
	34	negativ	negativ	negativ
	34	positiv	negativ	positiv
	34	positiv	negativ	positiv
14	37	negativ	negativ	negativ
15	39	positiv	negativ	negativ
	39	negativ	negativ	negativ
16	40	positiv	positiv	negativ
	40	positiv	negativ	negativ
17	42	positiv	negativ	negativ
	42	positiv	positiv	negativ
	42	positiv	negativ	negativ

8. ANHANG

	42	positiv	positiv	negativ
	42	positiv	negativ	negativ
	42	positiv	negativ	negativ
	42	positiv	negativ	negativ
18	47	negativ	negativ	negativ
	47	negativ	negativ	negativ
	47	negativ	negativ	negativ
	47	negativ	negativ	negativ
	47	negativ	negativ	negativ
19	48	negativ	negativ	negativ
	48	negativ	negativ	negativ
20	49	positiv	negativ	positiv
	49	positiv	negativ	negativ
	49	positiv	negativ	positiv
21	51	negativ	negativ	negativ
	51	negativ	negativ	negativ
	51	negativ	negativ	negativ
22	55	positiv	positiv	negativ
	55	positiv	positiv	positiv
	55	positiv	positiv	negativ
	55	positiv	negativ	negativ
23	58	negativ	negativ	negativ
	58	positiv	positiv	positiv
	58	positiv	negativ	positiv
	58	positiv	positiv	positiv
	58	positiv	negativ	positiv
	58	positiv	negativ	negativ
24	62	positiv	negativ	positiv
	62	positiv	negativ	positiv
	62	positiv	negativ	positiv
	62	negativ	negativ	negativ
	62	positiv	positiv	positiv
	62	negativ	negativ	negativ
25	67	positiv	positiv	positiv
26	71	positiv	negativ	positiv
27	75	positiv	negativ	negativ
28	80	positiv	positiv	negativ
	80	positiv	positiv	negativ
	80	positiv	negativ	negativ
	80	positiv	positiv	negativ
29	81	positiv	positiv	negativ
	81	negativ	negativ	negativ
	81	negativ	negativ	negativ
30	86	negativ	negativ	positiv
	86	negativ	negativ	positiv
	86	negativ	negativ	negativ
31	90	negativ	negativ	negativ
	90	negativ	negativ	negativ

Tab. 12: Untersuchungsergebnisse der Hautproben von 100 Rotfüchsen zum Vorkommen von *B. burgdorferi*

FUCHS	PCR-ERGEBNIS
1	positiv
2	negativ
3	negativ
4	negativ
5	negativ
6	negativ
7	negativ
8	negativ
9	negativ
10	negativ
11	negativ
12	negativ
13	negativ
14	negativ
15	negativ
16	negativ
17	negativ
18	positiv
19	negativ
20	negativ
21	negativ
22	positiv
23	negativ
24	negativ
25	negativ
26	negativ
27	negativ
28	negativ
29	negativ
30	negativ
31	negativ
32	negativ
33	negativ
34	negativ
35	positiv
36	negativ
37	positiv
38	negativ
39	negativ
40	positiv
41	negativ
42	negativ
43	negativ
44	negativ
45	negativ
46	negativ
47	negativ
48	negativ
49	negativ
50	negativ
51	negativ
52	negativ

8. ANHANG

53	negativ
54	negativ
55	negativ
56	negativ
57	negativ
58	negativ
59	negativ
60	negativ
61	negativ
62	negativ
63	negativ
64	negativ
65	negativ
66	negativ
67	negativ
68	negativ
69	negativ
70	negativ
71	negativ
72	negativ
73	negativ
74	positiv
75	negativ
76	negativ
77	negativ
78	negativ
79	negativ
80	negativ
81	negativ
82	negativ
83	negativ
84	negativ
85	negativ
86	negativ
87	negativ
88	negativ
89	negativ
90	negativ
91	negativ
92	negativ
93	negativ
94	negativ
95	negativ
96	negativ
97	negativ
98	negativ
99	negativ
100	negativ