

Charakterisierung der humoralen Immunantwort des Pferdes nach Impfung
gegen drei Erreger der Lyme-Borreliose unter Berücksichtigung
zweier verschiedener Impfstrategien

von Jasmin Maria Knödseder

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Charakterisierung der humoralen Immunantwort des Pferdes nach Impfung
gegen drei Erreger der Lyme-Borreliose unter Berücksichtigung
zweier verschiedener Impfstrategien

von Jasmin Maria Knödseder
aus Zwiesel

München 2019

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph. D.

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer
Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke

Tag der Promotion: 25. Februar 2019

In Gedenken an meine liebevolle Oma

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Borrelien	3
2.1.1	Beschreibung der Mikroorganismen.....	3
2.1.2	Epidemiologie und Vektor.....	4
2.1.3	Pathogenese der Borrelieninfektion.....	7
2.2	Wirt	10
2.2.1	Klinische Erscheinungen der LB.....	10
2.2.1.1	Mensch	10
2.2.1.2	Pferd.....	12
2.2.2	Immunantwort nach Infektion mit <i>Bbsl</i>	17
2.3	Immunisierung	19
2.3.1	Schutzmechanismus der Immunisierung.....	19
2.3.2	Impfstoffe.....	21
2.4	Therapie	23
2.5	Diagnostik.....	25
2.5.1	Indirekte Nachweisverfahren von <i>Bbsl</i>	25
2.5.1.1	Immunfluoreszenztest (IFT)	26
2.5.1.2	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	27
2.5.1.3	Immunoblot.....	28
2.5.1.3.1	Western-Blot.....	28
2.5.1.3.2	Line immunoassay (LIA)	28
2.5.2	Direkte Nachweisverfahren von <i>Bbsl</i>	31
2.5.2.1	Mikroskopie und Kultivierung	31
2.5.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3	Pferde, Material und Methoden.....	33
3.1	Pferde	33
3.2	Impfstoff, Impfschema und Blutentnahmeintervalle	36
3.3	Vorgehensweise zur Immunisierung und Blutentnahme.....	37
3.3.1	Impfung.....	37
3.3.2	Blutentnahme.....	38
3.4	Blutaufbereitung und -konservierung.....	38
3.5	Kontrollseren, monoklonale Antikörper und rekombinantes OspA.....	38

3.6	Bakterienspezies für die in-vitro-Diagnostik.....	39
3.7	Herstellung der Antigenpräparation für die Verwendung im KELA	40
3.7.1	Herstellung des Kultivierungsmediums für <i>Bbss</i>	40
3.7.3	Kulturelle Anzüchtung der Borrelien und Herstellung des Antigenlysats.....	41
3.8	Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Bakteriensuspension.....	42
3.8.1	Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	42
3.8.2	Durchführung der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	44
3.8.2.1	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau R250.....	45
3.8.2.2	Proteinfärbung mit dem Silver Stain Kit der Firma Invitrogen	45
3.9	Indirekte Nachweisverfahren von <i>Bbsl</i>	46
3.9.1	Puffer, Lösungen und Reagenzien für das KELA-Verfahren	46
3.9.2	Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Herstellung des KELA.....	46
3.9.3	Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Durchführung des KELA	48
3.9.4	KELA.....	48
3.9.4.1	Herstellung der KELA-Platten.....	48
3.9.4.2	Durchführung des KELA	49
3.9.5	LIA der Firma Sekisui Virotech GmbH.....	50
3.9.5.1	Verbrauchsmaterial, Puffer und Lösungen für den LIA.....	50
3.9.5.2	Durchführung des LIA	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Voruntersuchung der Pferdeserumproben	53
4.1.1	Untersuchung mit dem KELA-Verfahren.....	53
4.1.2	Untersuchung mit dem LIA der Firma Sekisui Virotech GmbH.....	53
4.2	Humorale Immunantwort nach Immunisierung	55
4.2.1	Resultate des KELA-Verfahrens und des Borrelia Veterinär plus OspA LINE der Firma Sekisui Virotech GmbH.....	55
4.2.1.1	Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Impfgruppe A.....	55
4.2.1.2	Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Impfgruppe B.....	59
4.2.1.3	Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Kontrollgruppe C	61
4.2.1.4	Vergleich der serologischen Untersuchungsergebnisse der Impfgruppen A und B	62
4.3	Detektion von durch Impfung induzierten OspA-Antikörpern mithilfe rekombinanten OspA	64

4.3.1	KELA-Ergebnisse nach Verwendung von rOspA Antigen aus <i>Bbss</i> , <i>B. garinii</i> oder <i>B. afzelii</i>	64
4.3.2	Atypische KELA-Ergebnisse nach Verwendung von rOspA Antigen.....	69
4.4	Nachweis von Infektionen mit <i>Bbsl</i> Organismen	72
4.4.1	Infektionen nicht-immunisierter Pferde.....	72
4.4.1.1	KELA-Ergebnisse.....	72
4.4.1.2	Ergebnisse des Borrelia Veterinär plus OspA LINE.....	73
4.4.2	Infektionen nach Impfung gegen <i>Bbsl</i>	74
4.4.2.1	KELA-Ergebnisse.....	74
4.4.2.2	Ergebnisse des Borrelia Veterinär plus OspA LINE.....	75
5	Diskussion	77
6	Zusammenfassung	86
7	Summary	88
8	Literaturverzeichnis	90
	Danksagung	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Verbreitung der LB.....	4
Abbildung 2	Lebenszyklus von Schildzecken	7
Abbildung 3	Übersicht über die Verteilung der Pferde auf die einzelnen Gruppen	34
Abbildung 4	Zeitliche Abfolge der Immunisierungen und Blutprobenentnahmen der Pferde	37
Abbildung 5	Borrelia Veterinär plus OspA LINE zum Zeitpunkt 0	53
Abbildung 6	a) Darstellung des Gesamtantikörperverlaufs nach Impfung der Gruppe A, nachgewiesen durch <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler b, c) Die Antikörperproduktion von zwei mit EquiLyme® grund- immunisierten Pferden aus der Gruppe A dargestellt mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE	57
Abbildung 7	a) Darstellung des Gesamtantikörperverlaufs nach Impfung der Gruppe B, nachgewiesen durch <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler b) Die Antikörperproduktion eines dreimalig innerhalb von sechs Monaten immunisierten Pferden aus der Gruppe B dargestellt mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE	59
Abbildung 8	a) Darstellung des Gesamtantikörperverlaufs der Kontroll- gruppe C, nachgewiesen durch <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler b) Die Antikörperproduktion eines nicht-immunisierten Pferdes aus der Gruppe C dargestellt mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE	60
Abbildung 9	Vergleichende Darstellung des Antikörperverlaufs der Gruppe A und B nach Immunisierung, nachgewiesen durch <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler	62
Abbildung 10	a-c) Vergleichende Darstellung der OspA-Antikörperverläufe in den verschiedenen Gruppen, nachgewiesen mit rOspA aus <i>Bbss</i> ZS7, <i>B. garinii</i> ZQ1 oder <i>B. afzelii</i> PKo	66
Abbildung 11	a-c) Darstellung des OspA-Antikörperverlaufs nach Immuni- sierung von zwei Pferden aus der Gruppe A, nach- gewiesen mit rOspA der Genospezies <i>Bbss</i> ZS7, <i>B. garinii</i> ZQ1 oder <i>B. afzelii</i> PKo	68

Abbildung 12 Die Antikörperproduktion von zwei Pferden aus der Gruppe A nach zweimaliger Immunisierung dargestellt durch den Borrelia Veterinär plus OspA LINE	69
Abbildung 13 Darstellung des Gesamtantikörperverlaufes eines nicht-immunisierten Pferdes aus der Kontrollgruppe C, nachgewiesen mit <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund, ohne Standardfehler	70
Abbildung 14 Darstellung der qualitativen Antikörperantwort der Serumprobe „Pfd-139-C“ durch den Borrelia Veterinär plus OspA LINE	71
Abbildung 15 Darstellung der Antikörperverläufe von zwei Pferden aus der Gruppe A nach Immunisierung, nachgewiesen mit <i>Bbss</i> -Lysat und rOspA aus <i>Bbss</i> (Recombitek® Lyme) mit Hintergrund und ohne Standardfehler	73
Abbildung 16 Die Antikörperproduktion von zwei Pferden aus der Gruppe A nach zweimaliger Immunisierung mit EquiLyme®, dargestellt durch den Borrelia Veterinär plus OspA LINE	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Haupterreger der Lyme-Borreliose	5
Tabelle 2: Übersicht über die Herkunft und Anzahl der Pferde	36
Tabelle 3: Zusammensetzung des BSK II-Mediums	40
Tabelle 4: 1,5 M Tris-Cl, pH = 8,8 Stammlösung	42
Tabelle 5: 0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8 Stammlösung	42
Tabelle 6: 0,5 % Bromphenol-Blau-Stammlösung	42
Tabelle 7: Probenpuffer (ohne Glycerol) Stammlösung	42
Tabelle 8: 0,1 % SDS Überschichtungspuffer Stammlösung	43
Tabelle 9: 10 % Ammonium Persulfat-Arbeitslösung	43
Tabelle 10: 10 % SDS Arbeitslösung	43
Tabelle 11: Überschichtungspuffer	43
Tabelle 12: Waschpuffer	43
Tabelle 13: Laufpuffer	43
Tabelle 14: Auflösungsgel, 12 %ig	44
Tabelle 15: Sammelgel, 5 %ig	44
Tabelle 16: PBS 10-fach konzentriert (PBS 10 x)	46
Tabelle 17: 1 M Natriumcarbonat Stammlösung (Na ₂ CO ₃)	46
Tabelle 18: 1 M Natriumhydrogencarbonat Stammlösung (NaHCO ₃)	47
Tabelle 19: 0,1 M Carbonatpuffer Arbeitslösung (CO ₃)	47
Tabelle 20: 10 % SDS-Puffer	47
Tabelle 21: CO ₃ /ME/SDS (Antigen auflösende Reagenz)	47
Tabelle 22: PBST mit 2 % Milch	48
Tabelle 23: Packungsinhalt des Borrelia Veterinär plus OspA LINE für 32 Bestimmungen	50
Tabelle 24: Herstellung des endverdünnten Verdünnungs-/ Waschpuffer	50
Tabelle 25: Herstellung der IgG-Konjugatverdünnung	51
Tabelle 26: Bedeutung der Antigene im Borrelia Veterinär plus OspA LINE	52
Tabelle 27: Auswertungskriterien des Borrelia Veterinär plus OspA LINE beim Pferd	52
Tabelle 28: Vergleich der Ergebnisse im KELA- und LIA-Verfahren zum Zeitpunkt 0	55

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
<i>Bbss</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
<i>Bbsl</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
BSK II	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium II
CO ₃	Carbonat
CRASP	engl. complement regulator acquiring surface protein
Dbp	engl. decorin binding protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	<i>Erythema migrans</i>
Fa.	Firma
FH/FHL	engl. factor H/factor H-like
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonische Säure
HRP	horse raddish peroxidase
IFAT/IFT	Indirekter Immunfluoreszenz-Antikörpertest/Immunfluoreszenztest
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
ICL	Immunology Consultans Laboratory
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
KELA	engl. kinetic enzyme-linked immunosorbent assay
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KPL	Kirkegaard & Perry Laboratories
LB	Lyme Borreliose
LIA	Line Immuno Assay
M	Mol
ME	β-Mercaptoethanol
mg	Milligramm
min	Minute/Minuten
MKP	Modified Kelly Pettenkofer

ml	Milliliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Osp	engl. Outer-surface-protein
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
p.i.	post infectionem
s	Sekunden
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-Page	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	engl. toll-like-receptors
TMB	Tetramethylbenzidin
U/min.	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of America
VlsE	engl. Variable major protein-like sequence, expressed
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Spirochäten des *Borrelia-burgdorferi*-sensu-lato (*Bbsl*)-Komplexes verursachen sowohl bei Tieren als auch bei Menschen eine multisystemische Krankheit, die als Lyme-Borreliose (LB) bezeichnet wird. Namensgebend für diese Bakterien war Willy Burgdorfer, der die Spirochäten im Jahr 1982 entdeckte (BURGDORFER et al., 1982). In Europa fungieren vor allem Schildzecken der Art *Ixodes ricinus* (gemeiner Holzbock) als Vektoren. Diese infizieren sich durch den Saugakt an Wildtieren, vor allem an Mäusen (EBANI et al., 2012). Als Teil des *Bbsl*-Komplexes können in Europa mindestens drei Genospezies von Borrelien für die LB verantwortlich gemacht werden: *B. burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*), *B. afzelii* und *B. bavariensis* (BARANTON et al., 1992; CANICA et al., 1993; MARKOWICZ et al., 2015). Die humane LB ist wahrscheinlich die häufigste, durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre. Auch Tiere können mit Borrelien infiziert werden. Die klinischen Bilder beim Pferd sind nicht pathognomonisch für die Infektion, weshalb kein einheitliches Krankheitsbild beschrieben werden kann. Es existieren jedoch zahlreiche klinische Fallbeispiele, die im Rahmen von seroepidemiologischen Studien eine umfangreiche Palette an klinischen Veränderungen belegen. Diese umfassen Allgemeinstörungen, Gelenk- und Gliedmaßenmanifestationen in Form von Lahmheiten, neurologische Störungen, Hautveränderungen, Augenmanifestationen, Fortpflanzungsstörungen und Aborte (BURGESS et al., 1986; BURGESS & MATTISON, 1987; HAHN et al., 1996; PASSAMONTI et al., 2015). Störungen des muskuloskelettalen Systems sind die am häufigsten beschriebenen klinischen Erscheinungen nach einer Borrelieninfektion des Pferdes (FRITZ, 2018).

In Anbetracht des stetig wachsenden Infektionsdruckes in Endemiegebieten (RAUTER & HARTUNG, 2005) und der schweren Therapierbarkeit einer LB nimmt die Prävention einen hohen Stellenwert ein (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Eine prophylaktische Maßnahme stellt die Impfung gegen den Erreger dar. Für den Menschen besteht derzeit keine Möglichkeit, sich gegen die LB impfen zu lassen. Obwohl in den Neunziger Jahren auch in der Humanmedizin ein wirksamer Impfstoff verfügbar war (SIGAL et al., 1998; STEERE et al., 1998), wurde dieser aus verschiedenen Gründen kurze Zeit später wieder vom US-Markt genommen (HANSON & EDELMAN, 2003). Für Hunde hingegen stehen diverse kommerziell erhältliche Vakzinen zur Verfügung (TÖPFER, 2007). Seit Juni 2015 ist mit der Vakzine EquiLyme® ein Impfstoff gegen die LB für Pferde erhältlich. Das Wirkprinzip sollte eine Induktion von spezifischen Antikörpern gegen das Outer Surface Protein A (OspA) sein. Aufgrund des besonderen Schutzmechanismus der Impfung ist ein ausreichend hoher Antikörperspiegel notwendig, damit ein Infektionsschutz gewährleistet werden kann (GIPSON & DE SILVA, 2005). Neben einer ausreichend hohen Dosierung der Antigene ist auch die regelmäßige Wiederholung der Immunisierung

für eine erfolgreiche Impfung ausschlaggebend (GOLDE et al., 1997). Anhand von Studien aus der Humanmedizin wurde die Wirksamkeit von rekombinanten OspA-Vakzinen nach dreimaliger Impfung innerhalb von 12 Monaten geprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass 68 % der Probanden nach zweimaliger Immunisierung ausreichend geschützt sind, während eine dritte Auffrischungsimpfung nach einem Jahr in 92 % der Studienteilnehmer einen ausreichenden Antikörperspiegel induziert (SIGAL et al., 1998). Erfolgt dagegen eine zusätzliche Immunisierung innerhalb der ersten sechs Monate, so führt dies beim Menschen zu einem signifikant höheren Antikörperspiegel (VAN HOECKE et al., 1999). Anhand einer Impfstudie bei Hunden konnte gezeigt werden, dass eine dritte Immunisierung innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Grundimmunisierung keine signifikante Erhöhung des OspA-Antikörperspiegels mit sich bringt (TÖPFER, 2007). In Anbetracht der in Europa vorherrschenden Diversität an Borrelienspezies ist für einen umfassenden Infektionsschutz gegen die LB zudem eine speziesübergreifende Kreuzreaktivität erforderlich. Bisher wurden noch keine Studien über die Kreuzreaktivität bzw. -protektivität der aufgrund einer Immunisierung von Hunden induzierten OspA-Antikörper durchgeführt. Dennoch konnte anhand von Studien im europäischen Raum belegt werden, dass eine Kreuzreaktivität nur in sehr geringem Umfang existiert und Impfstoffe, die eine einzelne Spezies als Antigen enthalten, keinen ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit einer heterologen Spezies gewährleisten (GERN et al., 1997). Dies ist einerseits auf die hohe OspA-Variabilität zwischen den einzelnen Genospezies zurückzuführen. So sind die in Europa hauptsächlich vorkommenden Spezies *Bbss*, *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. bavariensis* mit sechs unterschiedlichen OspA-Serotypen assoziiert (RUZIC-SABLJIC et al., 2002). Andererseits lässt sich die geringe Kreuzreaktivität in der Spezifität der OspA-Antikörper begründen, indem die Antikörper spezifisch an ein bestimmtes Epitop des OspA binden (GOLDE et al., 1997).

Das Ziel der durchgeführten Studie war es, die Antikörperspiegel bei Pferden nach Infektion oder Immunisierung im zeitlichen Verlauf darzustellen. Anhand zwei unterschiedlichen Impfzeitplänen sollte zudem die Auswirkung der Impfhäufigkeit auf das Immunsystem veranschaulicht werden.

Da der Impfstoff EquiLyme® drei Vertreter der LB enthält, haben wir die Wirksamkeit der Vakzine nicht nur im Hinblick auf eine Antikörperinduktion gegen *Bbss*, sondern zudem gegen die Borrelienspezies *B. garinii* und *B. afzelii* untersucht.

2 Literaturübersicht

2.1 Borrelien

2.1.1 Beschreibung der Mikroorganismen

Borrelien sind spiralförmige Bakterien von 3 – 20 µm Länge und 0,2 – 0,5 µm Durchmesser, die im Jahr 1982 von Willy Burgdorfer entdeckt wurden (BURGDORFER et al., 1982). Namensgebend für diese Spezies war Amédée Borrell (WRIGHT, 2009). Die Gattung *Borrelia* zählt zur Familie der Spirochaetaceae, die wiederum der Ordnung Spirochaetales angehört. Spirochäten können mithilfe der Dunkelfeld- oder Phasenkontrastmikroskopie dargestellt werden. An beiden Polregionen der Bakterienzelle befinden sich Endoflagellen, die frei überlappend im mittleren Zellbereich enden (MOTALEB et al., 2000). Der Protoplasmazyylinder windet sich um den starren periplasmatischen Endoflagellenstab, wodurch die für die Spirochäten typische Schraubenform entsteht. Die Besonderheit der Schraubenbakterien ist ihre aktive Fortbewegung, die durch Kontraktion der Endoflagellen stattfindet (GRAY et al., 2002a). Dadurch findet eine Rotation der Spirochäten um ihre Längsachse statt. Bakterien der Familie Spirochaetaceae sind eigentlich gramnegativ. Aufgrund der schweren Anfärbbarkeit werden sie jedoch als gramlabil eingestuft (SCHWAN et al., 1995).

Die Gattung *Borrelia* umfasst eine Vielzahl von Borrelienspezies, die phylogenetisch in drei größere Gruppen eingeteilt werden können. Die Gruppe der Rückfallfieberborrelien beinhaltet derzeit 29 Spezies, die humanmedizinisch bedeutsam sind (CUTLER et al., 2017). Die zweite Gruppe wird von den Reptilien-assoziierten Borrelien (REP) gebildet, die erst kürzlich aus importierten Reptilien, bzw. deren Ektoparasiten isoliert werden konnten und mit der LB sowie dem Rückfallfieber verwandt sind (TAKANO et al., 2010). Den Reptilien-assoziierten Borrelien sind *B. turtica* und noch nicht benannte Spezies zuzuordnen (GÜNER et al., 2004). Die dritte große Gruppe wird vom *Bbsl*-Komplex gebildet, dem aktuell 21 Spezies angehören (CUTLER et al., 2017). Diese Gruppe wird zum Teil mit der LB assoziiert, die sowohl für den Menschen als auch für einige Tierarten von großer Bedeutung ist. Während in Nordamerika *Bbss* als einzige Borrelienspezies für die Lyme-Borreliose verantwortlich gemacht werden kann, sind im eurasischen Raum auch *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* als Krankheitsverursacher beim Menschen zu nennen (JOHNSON et al., 1984; CANICA et al., 1993; CASJENS et al., 2011; MARGOS et al., 2011). Nachdem der Nachweis von *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* und *B. miyamotoi* in der Cerebrospinalflüssigkeit von neurologisch erkrankten Menschen gelang, sind auch diese Spezies als Erreger der LB anerkannt (COLLARES-PEREIRA et al., 2004; DIZA et al., 2004; HOVIUS et al., 2013). Die Pathogenität der weiteren Spezies des *Bbsl*-Komplexes ist bisher noch nicht restlos geklärt (RUDENKO et al., 2011).

Allerdings wurden Änderungen in der Nomenklatur durchgeführt. So werden die für die LB verantwortlichen Genospezies neuerdings unter der Bezeichnung *Borrelia burgdorferi* geführt, wohingegen die Rückfallfieberborrelien weiterhin den Namen *Borrelia* tragen (ADEOLU & GUPTA, 2014).

Borrelien sind auf Wirtsorganismen angewiesen, um überlebensfähig zu sein. Für die Übertragung auf Wirbeltiere dienen den Bakterien Arthropoden. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Zecken, in einzelnen Fällen um Läuse. Das Reservoir für fast alle Borrelienspezies bilden Wildtiere (vorwiegend Kleinsäuger und Nagetiere) und Vögel (EBANI et al., 2012). Ursprünglich wurde angenommen, dass Borrelien der Rückfallfiebergruppe, abgesehen von *B. recurrentis*, einzig und allein durch Lederzecken übertragen werden, während *Bbsl* (mit Ausnahme von *B. sinica*) Schildzecken als Vektoren nutzen. Nachdem *B. miyamotoi* aus Zecken der Art *Ixodes ricinus* isoliert wurde, ist davon auszugehen, dass die Rückfallfieber-Borrelien auch Schildzecken infizieren (RUDENKO et al., 2011; ADEOLU & GUPTA, 2014).

2.1.2 Epidemiologie und Vektor

Die LB, verursacht durch Borrelien des *Bbsl*-Komplexes, ist die häufigste vektorassoziierte Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre. Die Verbreitung der LB in Europa deckt sich mit dem geographischen Vorkommen von *I. ricinus* und *I. persulcatus* (Osteuropa), während die LB in Asien und in den USA entsprechend dem Habitat von *I. scapularis* und *I. persulcatus* in Erscheinung tritt (GRAY, 1998).

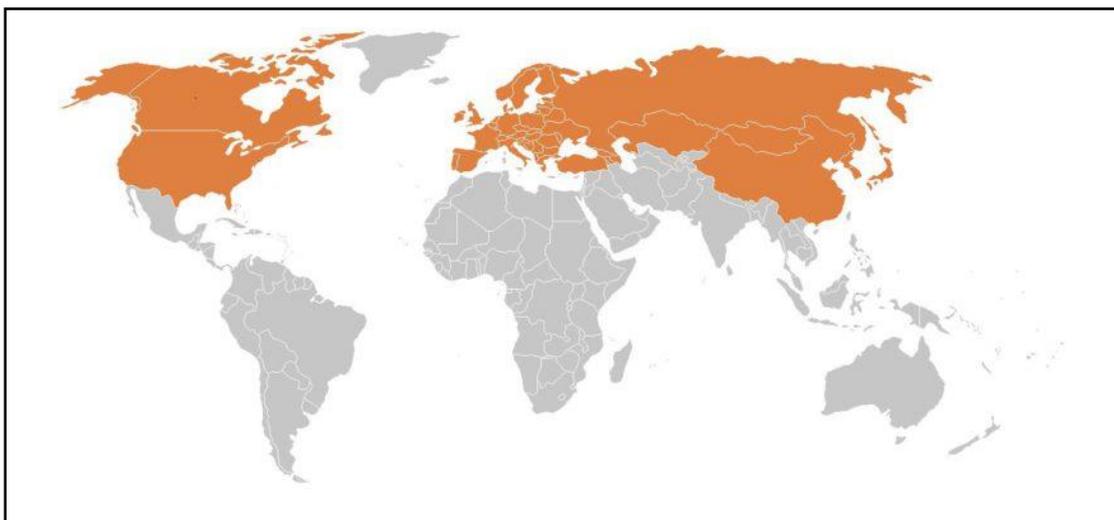


Abbildung 1

Verbreitung der LB (Quelle: <http://www.lyme-borreliose.info/zecken/>)

In den letzten zwanzig Jahren ist die Anzahl der Erkrankungen an humaner LB deutlich angestiegen. Während 1992 im US-amerikanischen Raum 9.908 Fälle von LB notiert werden konnten, waren es im Jahre 2006 mit 19.931 Neuerkrankungen mehr als doppelt so viele Menschen (BACON et al., 2008). In Ostdeutschland ist die Situation ähnlich: Im Jahr 2002 waren mit 17,8 LB-Erkrankten pro 100.000 etwa halb so viele Menschen betroffen als im Jahre 2009, in dem 31,7 Fälle pro 100.000 Einwohner verzeichnet wurden (ADLHOCH & POGGENSEE, 2010).

Die sowohl aus humanmedizinischer als auch aus veterinärmedizinischer Sicht klinisch relevanten *Borrelia* spp. des *Bbsl*-Komplexes lassen sich neben ihrer Genetik mehr oder weniger anhand ihres geographischen Vorkommens unterscheiden. In Nordamerika ist *Bbss* als einziges Agens für die LB verantwortlich zu machen, während in Europa neben *Bbss* auch *B. garinii*, *B. afzelii* und *B. bavariensis* als Infektionserreger bei Mensch und Tier nachgewiesen wurden (COUPER et al., 2010; HALOS et al., 2010; BALÁTOVÁ et al., 2011; HASLE et al., 2011). *B. bavariensis* ist erst seit kurzem als eigene Spezies anerkannt. Vorher wurde angenommen, dass es sich hierbei um eine an Säugetiere als Vektoren angepasste Variation von *B. garinii* handelt (MARGOS et al., 2009; SCHOLZ et al., 2013).

Tabelle 1: Haupterreger der Lyme-Borreliose

Spezies	Vorkommen	Vektoren	Reservoir	Referenzen
<i>Bbss</i>	Europa, Nordamerika	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	Kleinsäuger Vögel	(BACON et al., 2008; BARANDIKA et al., 2008)
<i>B. garinii</i>	Europa, Russland, China, Japan	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Vögel	(BARANTON et al., 1992)
<i>B. afzelii</i>	Europa, Russland, China, Japan	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Kleinsäuger	(CANICA et al., 1993; FOMENKO et al., 2009)
<i>B. bavariensis</i>	Zentraleuropa	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	Kleinsäuger	(SKUBALLA et al., 2012)

Wie FRANKE (2008) zeigte, ist jedoch eine hohe Variabilität in der Genospezieszusammensetzung innerhalb der Kontinente und Regionen zu verzeichnen. Das Vorkommen der Erreger ist einerseits von der Interaktion genetisch diverser Spezies mit dem Wirbeltierreservoir abhängig, andererseits werden Wirtstier und Mikroorganismen von einer Vielzahl biotischer und abiotischer Faktoren beeinflusst (RANDOLPH, 2011).

Um den Lebenszyklus der Borrelien aufrechtzuerhalten, sind neben den Zecken als Vektoren Reservoirwirte essentiell. Innerhalb dieser Wirtstiere müssen sich die Spirochäten vermehren und sich im Gewebe verteilen, damit diese von den Zecken aufgenommen werden können. Im Hinblick auf die LB gelten Vögel, Kleinsäuger und Reptilien als wichtige Reservoirs für Borrelien. Einige dieser Wirtstiere sind mit einer bestimmten Genospezies von Borrelien assoziiert. TARAGELOVÁ et al. (2008) beschrieb, dass *B. garinii* nur von Vögeln auf Zecken übertragen werden können. Dagegen sind *B. afzelii* und *B. bavariensis* auf Kleinsäuger als Reservoir angewiesen (HANINCOVÁ et al., 2003). Ein breiteres Wirtsspektrum nutzt *Bbss*. Diese Genospezies wurde sowohl aus Kleinsäugetieren als auch aus Vögeln isoliert (WRIGHT et al., 2000). Dass manche Borrelienspezies an spezifische Wirte adaptiert sind, lässt sich durch die Interaktion von Borrelien mit dem humanen Komplementsystem erklären. Die Genospezies *Bbss*, *B. afzelii* und *B. bavariensis* besitzen einen komplement-resistenten Phänotyp, wodurch sie sich über Mechanismen der Komplementregulation der Bakteriolyse entziehen können. Die Spezies *B. garinii* hingegen besitzt einen komplement-sensitiven Phänotyp. Dies erklärt, dass Säugetiere kein geeignetes Reservoir für *B. garinii* darstellen (KURTENBACH et al., 1998; KRAICZY et al., 2001; ULLMANN et al., 2003).

Der Gemeine Holzbock, *I. ricinus*, gehört zur Familie der Schildzecken und ist die häufigste mit *Bbsl* infizierte Zeckenart in Mitteleuropa (XU et al., 2003). Schildzecken zeichnen sich durch einen vierstufigen Lebenszyklus aus, der in etwa zwei bis sechs Jahre in Anspruch nimmt. Die weiblichen adulten Schildzecken leben in einer Strauchschicht bis 80 cm Höhe und stechen mit ihren speziellen Mundwerkzeugen vor allem größere Säugetiere wie Reh- und Schwarzwild, Kühe, Pferde, Hunde und Menschen. Auf diese Weise nehmen sie ihre Blutmahlzeit ein. Nachdem die Adulten sieben Tage an der Einstichstelle der Haut verbleiben, fallen sie ab und legen etwa 2000 Eier ab. Für die Entwicklung zur Larve dauert es bis zu zwei Monate. Die Larven leben in Vegetationsschichten bis zu 20 cm Höhe und saugen vor allem an Kleinsäugetieren, Vögeln und Reptilien. Nach drei Tagen lösen sich die Larven von der Haut und erreichen anschließend das Nymphenstadium. Nymphen leben in Vegetationsschichten bis 40 cm Höhe. Sie schließen den Zyklus, indem sie sich nach dem Saugvorgang an Kleinsäugetieren, Kühen, Pferden, Wildtieren und Menschen zu Adulten entwickeln. Somit ist der Lebenskreis von *I. ricinus* durch drei Blutmahlzeiten an unterschiedlichen Wirten gekennzeichnet (PIESMAN & GERN, 2004; STANEK, 2009). Die Übertragung der Borrelien des *Bbsl*-Komplexes von Schildzecken auf den Wirt findet während des Saugvorganges über den Speichel der Zecken statt. Arthropoden der Gattung *I. scapularis* und *I. pacificus* müssen für den Transfer von *Bbss* mindestens 36 Stunden

an der Einstichstelle verbleiben, während *I. ricinus* für die Infektion des Wirtstieres mit *B. afzelii* nach neuer Erkenntnis nur 17 Stunden benötigt (PEAVEY & LANE, 1995; KAHL et al., 1998; DES VIGNES et al., 2001; SCOLES et al., 2001; GRAY et al., 2002b). Da die transovarielle Übertragung der Borrelien von der adulten Zecke auf die im Eierstock befindlichen Eier keine Rolle spielt, sind Larven der Schildzecken keine Vektoren für die LB (EISEN et al., 2002). Neben dem Vorkommen von Wirtstieren ist der Lebenszyklus der Zecken von der Vegetationsperiode abhängig (GRAY et al., 2002b). *I. ricinus* und *I. persulcatus* zeigen von Frühjahr bis Sommer die höchste Aktivität. Die Nymphen von *I. scapularis* sind von Frühsommer bis Herbst aktiv, während die Adulten erst im Herbst aktiv werden und den Winter bei Temperaturen über 3° C überleben (EISEN et al., 2002).

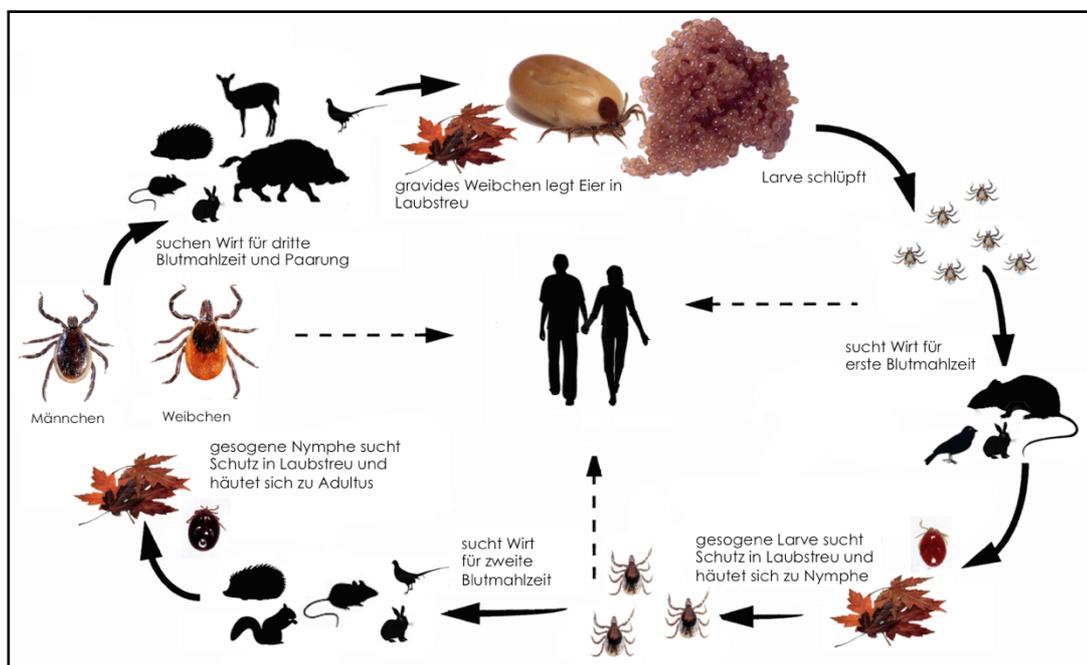


Abbildung 2

Lebenszyklus von Schildzecken. Aus Ektoparasiten in der veterinärmedizinischen Praxis, ein Leitfaden für die Kleintierpraxis. S. Pachnicke, D. Stanneck und N. Mencke, BAYER

2.1.3 Pathogenese der Borrelieninfektion

Borrelien werden beim Saugakt an einem infizierten Wirt aufgenommen und befinden sich dann im Mitteldarm der Schildzecken (BURGDORFER et al., 1982). Während der Blutmahlzeit wandern die Borrelien durch die Darmwand und gelangen über die Hae-molymphe zur Speicheldrüse der Zecken. Dort angelangt, werden sie mit dem Speichel auf das Wirtstier übertragen (GERN et al., 1990). Während des Saugaktes, der 60 bis 72 Stunden in Anspruch nimmt, müssen sich die Borrelien extremen Umwelteinflüssen

anpassen. Einerseits kommt es durch den Hautkontakt innerhalb der Zecken zu einem Temperaturanstieg, andererseits müssen sich die Borrelien mit dem Immunsystem des Wirtes, sowie Änderungen des pH-Wertes und des osmotischen Druckes auseinandersetzen. Derzeit können über die genauen pathogenetischen Vorgänge der Borrelien innerhalb der Zecke wenig Aussagen gemacht werden. Ein wichtiger Mechanismus für die Anpassung der Bakterien ist jedoch die Genregulation für die Outer Surface Proteine (Osp) der Borrelien. Von großer Bedeutung ist hierbei die sich gegenseitig beeinflussende Genexpression von OspA und OspC (BARBOUR & HAYES, 1986; WILSKÉ et al., 1986; SCHWAN et al., 1995; BUSCH et al., 1997). Während *Bbss* im Mitteldarm der Zecken vermehrt OspA auf der Oberfläche trägt, kann bei Isolation der Bakterien aus der Speicheldrüse vermehrt OspC detektiert werden (BURKOT et al., 1994; FINGERLE et al., 1995; SCHWAN et al., 1995). Die zunehmende Expression von OspA im Mitteldarm der Zecke konnte FINGERLE et al. (2002) ebenso für *B. garinii* und *B. afzelii* belegen, weshalb vermutet wird, dass OspA im Mitteldarm der Zecken als Adhäsion fungiert. Studien über die Expression von OspC während der Blutmahlzeit haben gezeigt, dass die Borrelien bei der Wanderung vom Mitteldarm zur Speicheldrüse sowie bei der Infektion des Wirtstieres vermehrt OspC als Oberflächenprotein exprimieren (MASUZAWA et al., 1994; DE SILVA & FIKRIG, 1995; MONTGOMERY et al., 1996; FINGERLE et al., 1998; SCHWAN & PIESMAN, 2000). Dies führt zur Annahme, dass OspC den Bakterien die Wanderung innerhalb der Zecke ermöglicht und somit entscheidend für die Infektion des Wirtes ist, während OspA den Bakterien das Verweilen im Darm zwischen den Blutmahlzeiten ermöglicht (FINGERLE et al., 2002). Zudem konnte in einer von SCHWAN et al. (2000) angelegten Studie gezeigt werden, dass im Mitteldarm von *Ixodes*-Larven nach einem 48-stündigen Saugakt an bereits mit Borrelien infizierten Mäusen der größte Anteil von OspC-tragenden Borrelien isoliert werden konnte. Zwölf Stunden nach dem Absetzen der Zecken von den Mäusen, kam es zu einem signifikanten Abfall der OspC-tragenden Borrelien, während der Anteil an OspA auf der Bakterienoberfläche anstieg. Daraus kann abgeleitet werden, dass im Wirtstier nach einer Infektion hauptsächlich OspC-tragende Borrelien vorhanden sind und der Wirt keine Antikörper gegen OspA induziert (KALISH et al., 1993; GOLDE et al., 1994; MONTGOMERY et al., 1996). Wie SCHWAN et al. (1995) anhand von in-vitro-Versuchen zeigten, scheint die Änderung der Oberflächenproteine der Borrelien von den Temperaturen innerhalb der Zecke und des Wirtes abhängig zu sein. Bei 33 °C herrschen für Borrelien die günstigsten Wachstumsbedingungen, wobei hier der höchste Anteil von OspC auf der Bakterienoberfläche detektiert werden kann (FINGERLE et al., 1995; AGUERO-ROSENFELD et al., 1996; AKINS et al., 1998).

Das Genom von *Bbsl* kodiert neben OspA und OspC für verschiedene Lipoproteine, die auf der Borrelienoberfläche lokalisiert sind und wichtige Virulenzfaktoren darstellen (FRASER et al., 1997; CASJENS, 2000). Einige dieser Proteine sind für die Persistenz der Borrelien in den Zecken von Bedeutung, während andere die Übertragung der Bakterien auf den Wirt ermöglichen. BBA64, ein 35-kDa schweres Antigen, scheint eine wichtige Rolle bei der Übertragung der Borrelien vom Vektor auf den Wirt oder während der akuten Phase der Säugetierinfektion einzunehmen (GILMORE et al., 2010). DbpA und DbpB, decorin-binding proteins A und B, binden an das wirtseigene Decorin, ein Bestandteil des Bindegewebes (GUO et al., 1995). Diese Oberflächenproteine können die Interaktion von *Bbsl* mit dem Bindegewebe vermitteln und sind an der Verteilung der Borrelien im Gewebe sowie an der Manifestierung von chronischen Infektionen in Decorin-reichen Geweben mitbeteiligt (CARROLL et al., 2000; OJAIMI et al., 2003; BLEVINS et al., 2008). BBK32, ein 47-kDa schweres Protein und OspF sind weitere Oberflächenantigene von *Bbsl* und ermöglichen die Verteilung der Borrelien im Säugetier (MILLER et al., 2000; LI et al., 2006; ANTONARA et al., 2007). Einen großen Stellenwert besitzt das 35-kDa schwere Lipoprotein VlsE (variable major protein-like sequence, expressed). Dieses Antigen ermöglicht den Borrelien durch Antigenvariationen dem wirtseigenen Immunsystem zu entfliehen. Dadurch kann *Bbsl* in Wirtstieren persistieren und sich in Form von chronischen Infektionen etablieren (ZHANG et al., 1997). Durch Mechanismen der Genkonversion können eine Vielzahl von VlsE-Varianten auftreten, die sich bereits vier Tage nach Infektion zeigen und bei Etablierung des Krankheitsgeschehens zunehmen (ZHANG & NORRIS, 1998). Somit ist VlsE als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von Borrelien anzusehen. Weitere Oberflächenantigene, die mit dem Immunsystem interagieren, sind CRASPs (Complement regulator-acquiring surface proteins). Diese Oberflächenproteine binden die löslichen Serumproteine factor H und/oder factor H-like-protein 1 (FH/FHL-1) des Wirtes (HARTMANN et al., 2006). FH/FHL-1 sind negative Regulatoren des Komplementsystems. Durch die Bindung dieser Serumproteine können die Borrelien der Zerstörung durch das wirtseigene Komplementsystem entgehen. Zusätzlich besitzt *Bbsl* Antigene, die nicht auf der Oberfläche der Borrelien zu finden sind. Ein Protein mit einem Molekulargewicht von 83-100 kDa, p83/100, ist ein immundominantes Protein, welches mit dem protoplasmatischen Zylinder oder den Flagellen der Borrelien assoziiert wird (LUFT et al., 1992). Dieses Protein ist hochspezifisch für *Bbsl* und besitzt in der Diagnostik einen hohen Stellenwert (BRUCKBAUER et al., 1992). Ebenfalls relevant für die Diagnostik ist das 39-kDa schwere Antigen BmpA (SIMPSON et al., 1990). SHIN et al. (2004) spricht diesem Protein eine wichtige Rolle beim Metabolismus der Borrelien zu, während PAL et al. (2008) BmpA mit der Entstehung einer Lyme-Arthritis assoziiert.

2.2 Wirt

2.2.1 Klinische Erscheinungen der LB

2.2.1.1 Mensch

Früher wurde die LB des Menschen entsprechend dem zeitlichen Auftreten der verschiedenen Symptome in drei Stadien eingeteilt: lokalisierte, frühe disseminierte und späte LB (DATTWYLER, 1990; KALISH et al., 1993). Diese Einteilung lässt darauf schließen, dass die Infektion zu einer Aufeinanderfolge der verschiedenen Manifestationen führt. Jedoch verhindert der frühzeitige Einsatz von Antibiotika das Fortschreiten der Erkrankung. Darüber hinaus manifestiert sich die Krankheit individuell unterschiedlich. Deshalb werden die klinischen Erscheinungen neuerdings in Frühmanifestationen, die nach Tagen bis Wochen auftreten und in Spätmanifestationen, welche nach Monaten bis Jahren evident werden, unterteilt (STEERE, 2001).

Allgemeinsymptome

Im Anfangsstadium der Infektion kann es aufgrund der Erregerdissemination zu grippeähnlichen Symptomen kommen. Diese Beschwerden können vor oder zusammen mit einem Erythema migrans auftreten (STEERE et al., 1983; STEERE et al., 2003).

Kutane Manifestationen

Erythema migrans (EM)

Das EM (Wanderröte) ist sowohl in Europa als auch in den USA die häufigste klinische Erscheinung der LB (BERGDLUND et al., 1995; HUPPERTZ et al., 1999; STRLE, 1999). Diese spezifische klinische Veränderung erscheint in der Regel ein bis zwei Wochen nach der Infektion (SMITH et al., 2002). Die Wanderröte ist eine Entzündungsreaktion, die als Antwort eines funktionierenden Immunsystems auf das Eindringen der Pathogene in den Organismus anzusehen ist. Das Erythem breitet sich ausgehend von der Stelle des Zeckenbisses typischerweise zentrifugal aus. Im Gegensatz zu den USA tritt das EM in Europa häufiger zusammen mit Allgemeinsymptomen auf, wofür die im europäischen Raum verbreiteten Erreger *B. garinii* und *B. afzelii* verantwortlich gemacht werden (STRLE, 1999). Obwohl das EM über Tage, Wochen oder sogar Monate persistieren kann, heilt es letztendlich spontan ab. Bleibt diese Krankheitserscheinung jedoch unbehandelt, kommt es bei 78 % der Betroffenen zu späteren Manifestationen der LB (STEERE et al., 1987).

Borrelien-Lymphozytom

Eine seltene Frühmanifestation der LB ist das Borrelien-Lymphozytom (Lymphadenosis

benigna cutis). Die blaurote, großknotige, umschriebene Hautschwellung zeigt sich wenige Wochen bis Monate nach dem Zeckenstich und betrifft meistens Kinder (MARASPIN et al., 2002).

Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

Die ACA ist eine mögliche Spätmanifestation der LB, die bisher nur in Europa beschrieben wurde. Ältere Menschen sind am häufigsten betroffen (STANEK & STRLE, 2008). Bei den meisten Patienten konnte *B. afzelii* als Krankheitsverursacher verantwortlich gemacht werden. Von der ACA sind typischerweise die Streckseiten der Extremitäten betroffen. Das Anfangsstadium zeigt sich anhand einer ödematösen Schwellung mit zunehmender blauroter Verfärbung der Haut. Bei unbehandelten Patienten kommt es im späten Krankheitsgeschehen zu einer Hautatrophie. Darüber hinaus kann auch eine Polyneuropathie auftreten, die in schweren Fällen zu Gelenksdeformationen führen kann (BREHMER-ANDERSSON et al., 1998; MÜLLEGGER & GLATZ, 2008).

Organmanifestationen

Lyme-Borreliose-Karditis

In Europa ist die Lyme-Borreliose-Karditis eine seltene Frühmanifestation der LB (SIGAL, 1995). Diese zeigt sich im Mittel 21 Tage nach dem Auftreten eines EM (CADAVID et al., 2004). Sowohl Atrioventrikular-Blockierungen und Arrhythmien (COSTELLO et al., 2009) als auch Myo-, Peri- und Endokarditiden können auf eine Lyme-Karditis hinweisen (WORMSER, 2006; MUNK et al., 2007).

Neurologische Manifestationen

Akute Neuroborreliose

Die häufigste im Zusammenhang mit einer akuten Neuroborreliose einhergehende klinische Erscheinung ist die Meningoradikulitis, auch bekannt als Bannwarth-Syndrom (ACKERMANN et al., 1984; HANSEN et al., 2013).

Chronische Neuroborreliose

Monate bis Jahre nach der Infektion mit *Bbsl* kann es zu chronischen neurologischen Erkrankungen kommen. Die chronisch progrediente Borrelien-Enzephalitis/-Enzephalomyelitis und die zerebrale Vaskulitis stellen die häufigsten Ausprägungen einer das ZNS betreffenden Spätmanifestation der LB dar. Die ACA-assoziierte Polyneuropathie, die sich bei 40 % der ACA-Betroffenen Patienten entwickelt, betrifft dagegen die peripheren Nerven (REIBER et al., 2013).

Muskuloskeletale Manifestationen

Lyme-Arthritis

Die durch *Bbsl* verursachte meist asymmetrisch auftretende Mono- oder Oligoarthritis manifestiert sich typischerweise viele Wochen bis Monate nach der Infektion (STEERE et al., 1987). Häufig sind die Kniegelenke von der Lyme-Arthritis betroffen (THOMPSON et al., 2009). Der Verlauf der Erkrankung ist intermittierend und durch rezidivierende Episoden unterschiedlicher Dauer gekennzeichnet. Dabei existieren auch symptomfreie Intervalle von mehreren Wochen (STEERE et al., 1987).

Myositis

Die LB manifestiert sich nur selten in Myositiden. Dabei präsentieren sich die Patienten typischerweise mit einem diffusen Muskelschmerz, der mit einer Muskelschwäche einhergeht (HOLMGREN & MATTESON, 2006).

2.2.1.2 Pferd

Im Gegensatz zum Menschen lassen sich die klinischen Erscheinungen der LB bei Pferden nicht in Stadien einteilen. Dies liegt daran, dass beim Pferd bisher kein einheitliches Krankheitsbild beschrieben werden kann. Dennoch existieren zahlreiche klinische Fallbeispiele aus dem In- und Ausland (BURGESS & MATTISON, 1987; HAHN et al., 1996; LIEBISCH, 1997; DEVILBISS et al., 2009). Die darin beschriebenen klinischen Veränderungen sind jedoch nicht eindeutig. Außerdem gilt zu berücksichtigen, dass bei dem Großteil der Pferde bereits der positive Antikörpernachweis zur Diagnosestellung geführt hat. Der Nachweis von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern in Pferdeseren beweist lediglich den Kontakt des Pferdes mit Borrelien und steht nicht im Zusammenhang mit dem Auftreten von klinischen Veränderungen (STRAUBINGER, 2017). Nachfolgend werden diverse Fallberichte über klinische Manifestationen der LB und dem damit verbundenen direkten Nachweis von *Bbsl* beim Pferd näher erläutert.

BURGESS (1986) berichtete über ein zwölf Jahre altes Pony aus Wisconsin, USA, welches aufgrund eines bilateralen Karpalgelenksergusses und damit verbundener Lahmheit vorgestellt wurde. Die Lahmheit wurde vor sechs Monaten das erste Mal beobachtet und zeigte sich in Form von rezidivierenden Krankheitserscheinungen. Als Ursache wurde eine schwere degenerative Karpalgelenksentzündung diagnostiziert. Zusätzlich zur Bewegungseinschränkung zeigte das Pferd eine Corneatrübung. Die ophthalmoskopische Untersuchung ergab eine ulzerative Keratitis, ein generalisiertes Corneaödem, eine Konjunktivitis sowie eine Uveitis, die vorwiegend das linke Auge betraf. Die Untersuchung von Serum- und Synovialproben mittels indirektem Immunfluoreszenztest (IFAT) führte zu Antikörpertitern in Höhe von 1:1024 und somit zu einem indirekten Nachweis von *Bbss*. Dagegen ergaben weder serologische noch bakteriologische Untersuchungen des Kammerwassers nach Euthanasie des Tieres Hinweise auf das

Vorhandensein von Borrelien. Der gelungene mikroskopische Nachweis von Spirochäten in der linken Augenkammer, die mit Hilfe des direkten Immunfluoreszenztest (DIFT) als *Bbss* identifiziert wurden, trug im Kontext mit dem vorausgegangenen positiven IFAT zur Diagnose der LB bei.

Über ein Pferd mit neurologischen Erscheinungen im Zusammenhang mit einer LB berichteten BURGESS et al. (1987). Demnach zeigte ein 6-jähriger Wallach in Wisconsin, USA, Symptome einer progressiven Enzephalitis. Diese äußerten sich in Form von Kopfschiefhaltung, Schweiflähme, Dysphagie und ständiger Unruhe. Nach Euthanasie des Tieres konnten aus dem Hirngewebe Spirochäten durch Anzucht in einem modifizierten Kelly-Medium isoliert werden. Der direkte Nachweis von Borrelien aus dem Gehirn konnte anschließend mittels DIFT erbracht werden. Der Antikörpernachweis gegen *Bbss* gelang mit Hilfe des IFAT und erbrachte einen Antikörpertiter von 1:2048.

Im Jahr 1996 konnte mittels PCR die erste klinisch auffällige LB bei einer neunjährigen Stute aus dem Vereinigten Königreich bestätigt werden. Das Pferd zeigte seit mehreren Wochen eine progrediente Lethargie, Anorexie, Fieber und eine Ataxie mit Hyperaesthesie des Kopfes. Mit Fortschreiten des Krankheitsgeschehens kam es weiterhin zu folgenden klinischen Erscheinungen: Arthritis der Karpalgelenke, vermehrte Füllung der Sehnenscheiden, akute Uveitis, Hypersensitivität der Beckengliedmaßen und der Perinealregion, stereotypes Umherlaufen und eine Depression bis hin zum Stupor. Nach Auftreten von Exzitationen wurde das Pferd euthanasiert. Die postmortale Untersuchung von Gewebeproben aus Leber, Milz, Lunge, Gehirn, Haut und Synovialmembran mittels PCR erbrachte den direkten Nachweis von Borrelien (HAHN et al., 1996).

Im Jahr 2010 wurde in Pennsylvania ein 12-jähriger Wallach mit Nackensteifheit und Leistungsabfall vorgestellt. Die klinische Untersuchung ergab eine erhöhte Temperatur von 38,5 °C und eine eingeschränkte Beweglichkeit von Kopf und Nacken. Die anschließende radiologische und szintigraphische Darstellung des Nackens blieb ohne Ergebnisse. Die Blutanalyse ergab eine relative Lymphopenie und erhöhte Werte für das Plasma-Fibrinogen. Zusätzlich waren Antikörper gegen *Bbss* nachweisbar. Die mittels Cerebrospinalflüssigkeit durchgeführte PCR erbrachte den direkten DNA-Nachweis von *Bbss*. Immunologische Tests der Cerebrospinalflüssigkeit resultierten in einer ausgeprägten B-Zell-Lymphopenie und einer niedrigen IgM-Konzentration, die auf eine Immundefizienz schließen lassen. Der Wallach wurde anschließend über 60 Tage mit Doxzyklin behandelt. Obwohl sich der Gesundheitszustand des Pferdes daraufhin deutlich besserte, kam es zwei Monate nach Abschluss der Antibiotikatherapie erneut zu der initial beschriebenen Nackensteifheit sowie zu progressiven neurologischen Ausfällen. Trotz intravenöser Verabreichung von Oxytetracyklin verschlechterte sich der Zustand

des Pferdes, weshalb schließlich die Euthanasie durchgeführt wurde. Die postmortalen Untersuchungen ergaben eine Leptomeningitis, eine lymphohistiozytische leptomeningeale Vaskulitis und eine periphere Radikuloneuritis mit Wallerscher Degeneration. Aufgrund dieser Befunde wurde letztendlich eine Neuroborreliose diagnostiziert (JAMES et al., 2010).

In Newtown, USA, wurde eine 10-jährige Belgische Warmblutstute wegen kutanen Plaques über dem rechten *Musculus masseter* in der Klinik vorgestellt. Der Besitzer berichtete, dass an der betroffenen Stelle drei Monate zuvor eine adulte Zecke entfernt wurde. Vor dem Zeckenstich hatte die Stute keinerlei Hautprobleme oder Traumata erlitten. Die klinische Untersuchung ergab im ventrolateralen Masseterbereich multiple Papeln zwischen 2 mm und 7 mm Durchmesser, welche bei Palpation nicht schmerzhaft waren. In naher Umgebung der Papeln waren gestaute Lymphbahnen auffällig. Ebenso war der rechte Mandibularlymphknoten vergrößert, aber nicht schmerzhaft. Aufgrund des beobachteten Zeckenstiches wurde sowohl ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), als auch ein Western-Blot zum serologischen Nachweis einer LB durchgeführt. Der Antikörpertiter von 1:1024 wurde als stark positiv interpretiert, das Ergebnis des Western-Blots als moderat positiv und indikativ für eine Infektion mit *Bbss*. Danach wurden zwei 6-mm große Stanzbiopsien aus den Papeln entnommen und mikroskopisch untersucht. Dabei waren diffuse oberflächliche bis tiefe dermale Infiltrate auffällig, die aus kleinen Lymphozyten, Histozyten und Riesenzellen bestanden. Basierend auf den histopathologischen Befunden, wurde ein T-Zell-reiches B-Zell-Lymphom hinter den kutanen Veränderungen vermutet. Die immunhistochemische Untersuchung ergab eine Lymphozytenpopulation bestehend aus T- und B-Zellen. Des Weiteren konnten um die Kapillaren B- und T-Zell-Aggregate in Verbindung mit hyperplastischen Endothelzellen nachgewiesen werden. Basierend auf den immunhistochemischen Befunden, wurden die Läsionen als gemischte lymphoide Hyperplasien interpretiert, die eine Form des Pseudolymphoms darstellen. Die anschließende PCR des Probenmaterials war positiv für *Bbss*. Im Zusammenhang mit dem Vorbericht des Zeckenstiches an den veränderten Hautarealen, wurde die Diagnose Borrelien-assoziiertes kutanes Pseudolymphom gestellt. Daraufhin wurde die Stute 30 Tage lang mit Doxzyklin behandelt. Vier Monate später wurde das Pferd zur Nachuntersuchung vorgestellt. Die Hautveränderungen waren vollständig abgeheilt. In der Kontrolluntersuchung sechs Monate später konnte kein Rezidiv beobachtet werden (SEARS et al., 2012).

Um die Aussagen über die klinischen Erscheinungen der LB des Pferdes präzisieren zu können und die humorale Immunantwort des Pferdes auf eine Borrelieninfektion zu charakterisieren, wurden im Jahre 1999 von CHANG und Mitarbeitern (2000) erstmals Infektionsversuche von Pferden mittels Zeckenexposition durchgeführt. Zunächst wurden

potenziell infizierte Zecken aus Westchester County, New York, gesammelt und deren Infektionsrate mit *Bbss* ermittelt. Dazu wurden 20 gesammelte Zecken zerkleinert und in BSK-II-Medium kultiviert. Mit Hilfe der Dunkelfeldmikroskopie sowie des IFAT konnte anschließend eine Infektionsrate mit *Bbss* von 55 – 60 % ermittelt werden. In einem ersten Infektionsversuch wurden acht spezifisch pathogenfreie (SPF)-Ponys über einen Zeitraum von sieben Tagen mit jeweils 30 der zuvor gesammelten Schildzecken exponiert, während an eine Kontrollgruppe von vier SPF-Ponys nicht-infizierte Nymphen angesetzt wurden. Neun Monate nach der Zeckenexposition wurden alle Pferde euthanasiert. Beginnend mit dem Zeitpunkt der Zeckenexposition wurden die Ponys in zweiwöchigen Intervallen serologisch mittels kinetic ELISA (KELA) und Western-Blot auf das Vorhandensein von *Bbss*-spezifischen Antikörpern untersucht. Alle Pferde, die mit *Bbss*-infizierten Zecken exponiert wurden, entwickelten fünf bis sechs Wochen nach der Zeckenexposition detektierbare Antikörper, die über einen Zeitraum von drei bis vier Monaten stetig anstiegen. Im weiteren Zeitverlauf bewegten sich die borrelienspezifischen Antikörper bis zum Studienende auf einem konstanten Niveau. Bei der Kontrollgruppe konnten dagegen keine *Bbss*-spezifischen Antikörper detektiert werden. Weiterhin wurden in monatlichen Abständen Hautbiopsien im Bereich der Zeckenstiche durchgeführt, die mittels Kultivierung sowie anschließender Dunkelfeldmikroskopie und IFA auf Borrelien untersucht wurden. Hierbei gelang bei allen mit *Bbss*-infizierten Zecken exponierten Ponys der direkte Erregernachweis, während bei der Kontrollgruppe keine Borrelien isoliert werden konnten. Postmortal wurden Gewebeproben aus unterschiedlichen Organen entnommen und mittels Kultur und PCR im Hinblick auf eine Infektion mit *Bbss* untersucht. Während alle Gewebeproben von den Tieren aus der Kontrollgruppe PCR-negativ waren, lieferte die PCR bei Untersuchung der mit infizierten Zecken exponierten Ponys in vielen Geweben (Lymphknoten, Muskeln, Synovialmembran, Nieren) den direkten Nachweis von *Bbss*. Obwohl die Pferde durch die Exposition mit infizierten Zecken experimentell mit Borrelien infiziert wurden, konnten bei keinem Tier klinische Veränderungen einer LB beobachtet werden (CHANG et al., 2000).

Zur Evaluierung des Infektionsschutzes nach Impfung gegen *Bbss* führten CHANG und Mitarbeiter (1999) einen zweiten Infektionsversuch von Pferden durch. Zunächst wurden acht SPF-Ponys mit rekombinantem OspA (rOspA) aus *Bbss* Stamm B31 geimpft. Weitere vier SPF-Ponys wurden nicht immunisiert. Im Anschluss wurden alle Ponys mit *Bbss*-infizierten Zecken (s. o.) exponiert. Bei den nicht immunisierten Pferden konnten zwei bis drei Monate nach der Zeckenexposition Antikörper mittels KELA detektiert werden, die über den Zeitraum des Versuches von etwa vier Monaten persistierten. Bei den geimpften Tieren fand die Zeckenexposition zum Zeitpunkt eines durch Impfung indu-

zierten hohen Antikörperspiegels statt. Nach der Zeckenexposition war bei den immunisierten Ponys ein Abfall der Antikörperspiegel zu beobachten. Die serologische Untersuchung mittels Western-Blot ergab bei den geimpften Ponys drei Wochen nach der Immunisierung eine Bande bei dem Protein OspA, während die Analyse der nicht geimpften Tiere acht bis zehn Wochen nach der Zeckenexposition ein breites Bandenspektrum lieferte. Bei der Obduktion der nicht immunisierten Ponys gelang die Isolation von *Bbss* sowohl aus Lymphknoten als auch aus Muskeln, Gelenken und Schilddrüse. Bei den immunisierten Pferden verlief der direkte Erregernachweis aus postmortalem Gewebe negativ. Die Pferde innerhalb der Kontrollgruppe und die geimpften Tiere wiesen während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine klinischen Anzeichen einer LB auf (CHANG et al., 1999).

In Europa kann anhand bisheriger Untersuchungen von Pferden kein Zusammenhang zwischen klinischen Erscheinungen und positivem serologischen Nachweis von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern festgestellt werden. In der Chirurgischen und Medizinischen Tierklinik der LMU München wurden 232 Pferdeseren im Hinblick auf das Vorhandensein von borrelienspezifischen Antikörpern untersucht. Obwohl bei 112 Probandenseren ein positiver Antikörpernachweis mittels IFAT gelang, konnten bei keinem Pferd klinische Erscheinungen im Sinne einer LB beobachtet werden (GERHARDS & WOLLANKE, 1996). In Schweden konnten EGENVALL und Mitarbeiter (2001) anhand von 2.018 untersuchten Pferdeseren mittels IFAT ebenfalls keine Korrelation zwischen positivem Antikörpernachweis und klinischen Erscheinungen, die mit einer LB zu vereinbaren sind, feststellen. Ferner untersuchte die Freie Universität Berlin mittels verschiedenen ELISA-Systemen 220 klinisch unauffällige Pferde auf das Vorhandensein von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern. Zusätzlich wurden die Vollblutproben von 117 klinisch auffälligen Pferden mittels direkten Nachweisverfahren von *Bbsl* analysiert. Obwohl eine Seroprävalenz von bis zu 61,1 % ermittelt werden konnte und der direkte Erregernachweis mittels PCR in 16 % der untersuchten Proben positiv war, konnte kein Zusammenhang mit den klinischen Erscheinungen der Pferde beobachtet werden (SCHÖNERT et al., 2002).

Neben Pferden können auch Katzen und Hunde an einer LB erkranken. Obwohl kein EM beobachtet werden kann, werden Hunde in der ersten Phase des Infektionsgeschehens durch Fieber von bis zu 40,5 °C, Fressunlust und Mattigkeit auffällig (APPEL, 1990). Wochen bis Monate später kommt es zur zweiten Erkrankungsphase. Hier ist das klinische Erscheinungsbild von einer Lahmheit geprägt, die auch ohne Verabreichung von Medikamenten nach wenigen Tagen wieder abklingen kann (STRAUBINGER et al., 1998a). Sofern zeitnah nach dem Auftreten der Lahmheit keine adäquate Behandlung eingeleitet wird, kann sich eine chronisch-intermittierende Lahmheit entwickeln (APPEL

et al., 1993; STRAUBINGER et al., 1998b). Neben der am häufigsten mit der LB assoziierten Arthritis, kann sich eine Infektion mit dem *Bbsl* auch auf andere Organsysteme auswirken. So konnten bei histologischer Untersuchung von experimentell infizierten Hunden Perineuritiden und Meningitiden nachgewiesen werden (STRAUBINGER et al., 1997a). Weiterhin kann es aufgrund einer schweren Glomerulonephritis zu Nierenversagen kommen. Hierbei ist das klinische Erscheinungsbild durch starke Abmagerung, Erbrechen und lethargischem Verhalten gekennzeichnet (DAMBACH et al., 1997).

2.2.2 Immunantwort nach Infektion mit *Bbsl*

Während der Blutmahlzeit gelangen Spirochäten des *Bbsl*-Komplexes zusammen mit dem Speichel von Schildzecken in die Haut des Wirtes. Von dort aus verteilen sich die Borrelien, vorwiegend extrazellulär verbleibend, im Körpergewebe des Wirtes (STRAUBINGER et al., 1997b) und verursachen vorzugsweise klinische Veränderungen in Gelenken, Herzmuskel, Nervensystem oder entfernten Hautarealen (STEERE A.C., 2001). Sowohl an der Eintrittsstelle als auch während der Verteilung der Borrelien innerhalb des Organismus, müssen sich die Bakterien mit dem angeborenen Immunsystem des Wirtes auseinandersetzen. Die ersten unspezifischen Reaktionen des Immunsystems sind durch das Einwandern von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMNs) sowie dem Vorhandensein von Makrophagen und Plasmazellen gekennzeichnet (STRAUBINGER et al., 1997b; HARTER et al., 1999). Nachfolgend wird durch die Degranulierung der PMNs eine Entzündungsreaktion im Wirt initiiert (HARTER et al., 1999). Neben dem angeborenen Immunsystem leistet das humorale Immunsystem einen wichtigen Beitrag im Kampf gegen *Bbsl*. In den ersten Wochen nach der Borrelieninfektion werden Immunglobuline der Klasse M synthetisiert (CRAFT et al., 1984). Anschließend ändert sich die Immunglobulinklasse von IgM zu IgG. Dieser Klassenwechsel dient dem Zweck der Erregerelimination, indem die Phagozytose durch PMNs und Makrophagen herbeigeführt wird (COLLINS, 2016). Nachdem Hunde experimentell mit Hilfe von Zecken infiziert wurden, konnten vier bis sechs Wochen nach der Zeckenexposition die ersten Immunglobuline der Klasse G detektiert werden. Sechs bis acht Wochen später konnte ein Anstieg von IgG verzeichnet werden. Dieser hohe Antikörpertiter konnte über einen Zeitraum von von 560 Tagen nachgewiesen werden (STRAUBINGER, 2000). Richtet man ein Augenmerk auf die genaue Charakterisierung der Antikörper, so sind in Seren von *Bbsl*-infizierten Menschen und Hunden im frühen Infektionsgeschehen vornehmlich Antikörper gegen OspC und Flagellin (p41) nachweisbar (DRESSLER et al., 1993; ENGSTROM et al., 1995; AKIN et al., 1999). Außerdem ist eine unspezifische Immunreaktion gegen die Borrelienantigene p100, p66 und VlsE zu beobachten. Im späteren Infektionsgeschehen, vier bis fünf Monate nach einer Borrelieninfektion, kann eine

signifikante Abnahme der gegen OspC gerichteten Immunglobuline verzeichnet werden (WAGNER et al., 2012). Dagegen können sowohl in der akuten Phase der Infektion als auch in der Konvaleszenzphase keine nennenswerten Antikörpertiter gegen das OspA der Borrelien detektiert werden (STEERE, 2001).

Die adaptive Immunantwort des Pferdes auf eine Infektion mit *Bbsl* ist nach bisherigen Erkenntnissen mit der Antikörperantwort des Hundes vergleichbar. Im Anfangsstadium der Infektion sind größtenteils Antikörper gegen OspC und p41 detektierbar (CHANG et al., 2000; WAGNER et al., 2012), während chronische Krankheitsstadien eine Antikörperproduktion gegen OspF und C6, der invariable Bereich IR6 des VlsE-Antigens, vermuten lassen (WAGNER et al., 2012).

Trotz wirtseigener spezifischer und unspezifischer Immunabwehrmechanismen können Bakterien des *Bbsl*-Komplexes im Wirt persistieren und eine chronische LB verursachen. Dazu haben die Pathogene spezifische Mechanismen entwickelt, um sich vor der Immunabwehr des Wirtes zu schützen. Im Zusammenhang mit dem Bakterientransfer von der Zecke auf den Wirt nutzen Borrelien unter anderem die immunmodulatorische und anti-entzündliche Eigenschaft des Zeckenspeichels, indem das Oberflächenantigen OspC das Salp15 (salivatory protein) im Zeckenspeichel bindet. Dadurch wird die Bindung von bakteriziden OspC-spezifischen Antikörpern und damit verbunden die Lyse durch Komplement inhibiert (RAMAMOORTHI et al., 2005). Zudem besitzen die Genospezies *Bbss*, *B. afzelii* und *B. bavariensis* im Gegensatz zu *B. garinii* einen komplementresistenten Phänotyp. Diese „natürliche“ Komplementresistenz ermöglicht den Borrelien die Bindung von Komplementregulatoren an ihre Zelloberfläche, wodurch die Bakterien vor einer Bakteriolyse geschützt sind (HELLWAGE et al., 2001; KRAICZY et al., 2001; KURTENBACH et al., 2002). Ferner sind die beiden auf dem Plasmid Ip28-1 lokalisierten funktionellen Gene, BBF01 und VlsE, maßgeblich an den Prozessen der Immunevasion der Borrelien beteiligt (PURSER & NORRIS, 2000; LABANDEIRA-REY & SKARE, 2001; THOMAS et al., 2001). Das VlsE-Antigen kann während des Infektionsgeschehens im Wirt seine Antigenstruktur variieren, wodurch die Antigenbindung durch VlsE-spezifische Antikörper erschwert ist (ZHANG & NORRIS, 1998). VlsE besitzt zwei konstante Bereiche am N- und C-Terminus, die einen variablen Bereich von sechs variablen und sechs konstanten Regionen (invariable Region, IR 1-6) umrahmen (ZHANG et al., 1997; LIANG & PHILIPP, 1999). Während die hochkonstanten Bereiche von VlsE nicht verändert werden können und damit Ziel von spezifischen Antikörpern sind, führt die ständige Variation der variablen Regionen zu einer Produktion von Antikörpern, die keine geeigneten Bindungsstellen mehr finden (LIANG & PHILIPP, 1999; EICKEN et al., 2002). Darüber hinaus vollziehen Borrelien eine segmentale Rekombination, die durch eine Vielzahl von neuen Borrelien-Stämmen mit unterschiedlichen VlsE-Antigenen gekennzeichnet sind

(EMBERS et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit der Immunevasion ist die Biofilmbildung der Borrelien. Dadurch sind sie für das Immunsystem als auch für diverse Antibiotika unangreifbar (SAPI et al., 2012). Schließlich sind Borrelien pleomorphe Bakterien, die im Wirt sowohl die Spirochätenform als auch L- und zystische Formen annehmen. Die L-Form der Borrelien hat keine Zellwand, wodurch sich die Pathogene intrazellulär aufhalten können und wahrscheinlich vor einer Immunabwehr und einer Antibiotikatherapie geschützt sind (MIKLOSSY et al., 2008; BRORSON et al., 2009).

2.3 Immunisierung

Da eine Infektion mit Borrelien unmittelbar mit der Zeckenexposition einhergeht, bietet die regelmäßige Kontrolle der Körperoberfläche auf Zecken und deren zeitnahen Entfernung mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Zeckenzangen eine geeignete Vorbeugemaßnahme. Zusätzlich gibt es diverse Möglichkeiten zur Zeckenabwehr. Der Mensch kann sich dabei einer großen Palette von geeigneten Präparaten bedienen, die vornehmlich auf die Haut aufgetragen werden. Bei Hunden und Katzen können zur Zeckenabwehr sowohl wirksame Spot-on-Formulierungen mit repellierenden Eigenschaften, als auch Kautabletten Anwendung finden. Beim Pferd dagegen gestalten sich solche Prophylaxemaßnahmen schwierig. Derzeit sind für das Pferd lediglich Sprays kommerziell erhältlich, die den Wirkstoff Icaridin enthalten. Laut Herstellerangaben beträgt die Wirkdauer im Hinblick auf eine Zeckenabwehr lediglich vier Stunden, weshalb die Aufbringung in kurzen Zeitintervallen wiederholt werden muss. Die Immunisierung gegen *Bbsl* stellt dagegen sowohl für Hunde als auch für Pferde eine geeignete Präventivmaßnahme dar.

2.3.1 Schutzmechanismus der Immunisierung

Das Ziel der Immunisierung gegen die LB ist eine Induktion von Antikörpern gegen das OspA von *Bbsl*. OspA ist ein Oberflächenantigen, das maßgeblich an der Bindung des TROSPA (tick receptor for OspA) im Zeckendarm beteiligt ist und dadurch den Wanderungsprozess der Borrelien vom Darm zur Speicheldrüse der Zecken initiiert (PAL et al., 2004b). Der durch die Immunisierung hervorgerufene einzigartige Infektionsschutz basiert darauf, dass die mit *Bbsl*-infizierten Zecken während der Blutmahlzeit am Säugtier spezifische OspA-Antikörper des Wirtstieres aufnehmen, welche bereits im Mitteldarm der Zecke an das Oberflächenantigen der Borrelien binden. Dadurch wird einerseits die Haftung und andererseits das Austreten der Erreger durch die Darmwand der Zecken unterbunden, was wiederum dazu führt, dass die Bakterien nicht zur Speicheldrüse wandern können und dadurch eine Infektion des Wirtes vermieden wird. Gleichzeitig führt

die Antikörperbindung an das OspA innerhalb der Arthropoden zur Neutralisation der Borrelien (COUGHLIN et al., 1995; GIPSON & DE SILVA, 2005). Möglicherweise werden diese Effekte über Antikörper mit wachstumshemmenden und immobilisierenden Eigenschaften mediiert (FIKRIG et al., 1992). Bei diesem, auf OspA abzielenden Impfmechanismus gilt zu berücksichtigen, dass keine natürliche Auffrischung des wirtseigenen Immunsystems in Form einer regelmäßigen Erregerkonfrontation stattfindet, da die durch Impfung induzierten OspA-Antikörper die Borrelien bereits innerhalb der Zecke inaktivieren. Zudem unterliegen die aufgrund der Impfung induzierten Antikörper einem natürlichen Abbauprozess. Ein ausreichend hoher und damit protektiver OspA-Antikörperspiegel wird folglich nur durch eine regelmäßige, erfolgreich durchgeführte Immunisierung induziert (GOLDE et al., 1997). Die Protektivität eines hohen OspA-Antikörperspiegels konnte mittels Infektionsversuchen von geimpften Hunden bereits belegt werden (CHANG et al., 1995). Nach bisherigen Erkenntnissen ist ein hohes OspA-Antikörpersniveau in Pferden ebenfalls positiv mit einem Infektionsschutz korreliert (CHANG et al., 1999). Die durch Impfung induzierten Antikörper sind bei Pferden, Affen und Hunden komplementabhängig (CHANG et al., 1995). Studien mit Rhesusaffen ohne Komplementsystem konnten, abhängig vom verwendeten Borrelienstamm, eine 14 bis 3800-mal geringere Eliminationsrate belegen. Anhand der relativ ineffektiven komplementunabhängigen Eliminationsmechanismen der OspA-Antikörper kann die Abhängigkeit des Impfschutzes von der Höhe des Antikörperspiegels erklärt werden (NOWLING & PHILIPP, 1999). Durch eine auf dem Antigen OspA beruhende Immunisierung werden im Wirt Antikörper induziert, die ausschließlich an ein spezifisches Epitop des OspA binden (GOLDE et al., 1997). Die in Europa als Erreger der LB bekannten Spezies sind jedoch mit unterschiedlichen OspA-Serotypen assoziiert. *B. burgdorferi* enthält den Serotyp 1, *B. afzelii* den Serotyp 2, *B. garinii* die Serotypen 3, 5 und 6 und *B. bavariensis* den Serotyp 4 (RUZIC-SABLJIC et al., 2002; MARGOS et al., 2009). Für einen umfassenden Infektionsschutz vor einer LB erfordert die speziesspezifische Variabilität des OspA eine ausreichende Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Spezies. Bisher wurden noch keine Studien über die Kreuzreaktivität bzw. -protektivität der aufgrund einer Immunisierung von Hunden induzierten OspA-Antikörper durchgeführt. Dennoch konnte anhand von Studien im europäischen Raum gezeigt werden, dass eine Kreuzreaktivität nur in sehr geringem Umfang existiert und Impfstoffe, die rOspA aus einer einzelnen Spezies als Antigen enthalten, keinen ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit einer heterologen Spezies gewährleisten (GERN et al., 1997). Für eine erfolgreiche Impfung ist neben einer ausreichend hohen Dosierung der Antigene auch die regelmäßige Wiederholung der Immunisierung ausschlaggebend (GOLDE et al., 1997). Anhand von Studien aus der Humanmedizin wurde die Wirksamkeit von rekombinanten OspA-Vakzinen

nach dreimaliger Impfung innerhalb von zwölf Monaten geprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass 68 % der Probanden nach zweimaliger Immunisierung vor einer Infektion geschützt sind, während die dritte Auffrischung nach einem Jahr in 92 % der Fälle zu einem protektiven Antikörperspiegel führt (SIGAL et al., 1998). Erfolgt dagegen innerhalb der ersten sechs Monate eine zusätzliche Antigenverabreichung, können beim Menschen signifikant höhere Antikörperlevel detektiert werden (VAN HOECKE et al., 1999). Anhand einer mit Hunden durchgeführten Impfstudie, konnten TÖPFER et al. (2007) die Kinetik der Impfantikörper in Hunden veranschaulichen und aufzeigen, dass eine Auffrischungsimpfung innerhalb von zwei bis drei Wochen nach zweimaliger Immunisierung keinen signifikant höheren protektiven Antikörperspiegel mit sich bringt. Wie sich die Antikörpertiter bei Pferden nach Infektion oder Immunisierung im zeitlichen Verlauf darstellen, ist bisher nicht bekannt. Somit ist die Einschätzung der humoralen Immunantwort des Pferdes hinsichtlich Zeit und Verlauf erschwert. Anhand von Infektionsversuchen an Ponys konnten fünf bis sechs Wochen nach der Zeckenexposition borrelienspezifische Antikörper detektiert werden, die innerhalb von drei bis vier Monaten ihr Maximum erreichten und bis zum Ende des Versuches, nach neun Monaten nachweisbar waren (CHANG et al., 2000). Nach der Immunisierung von Pferden mit für Hunde zugelassenen Lyme-Vakzinen, die lediglich eine Genospezies als Antigen beinhalten, konnten niedrige und kurzweilige OspA-spezifische Antikörpertiter detektiert werden (GUARINO et al., 2017). Durch die Verfügbarkeit eines für Pferde zugelassenen Lyme-Impfstoffes, der drei Spezies des *Bbsl*-Komplexes als Antigen enthält, muss zunächst die humorale Immunantwort nach Immunisierung charakterisiert werden und in Abhängigkeit der Ergebnisse eine Impfeempfehlung abgegeben werden. Zur Präzisierung des durch die Immunisierung hervorgerufenen speziesübergreifenden Infektionsschutz des Pferdes muss die Antikörperinduktion sowohl gegen *Bbss* als auch gegen *B. garinii* und *B. afzelii* analysiert werden.

2.3.2 Impfstoffe

Die Erkenntnis, dass mittels OspA immunisierte Mäuse vor einer Infektion mit *Bbsl* geschützt sind, hat im Wesentlichen dazu beigetragen, OspA als Hauptantigen bei der Impfstoffentwicklung einzusetzen (FIKRIG et al., 1990; SCHAIBLE et al., 1990). Im Jahr 1998 war mit der Vakzine LYMERix™ der erste Impfstoff gegen die LB für den Menschen kommerziell verfügbar. Dieser enthielt als Antigen rOspA aus *Bbss*. Frühere Studien deuteten darauf hin, dass es eine autoimmune Komponente der LB gibt. Demnach würde eine Immunisierung mit OspA die klinischen Ausprägungen einer bereits vorhandenen LB potenzieren (KALISH et al., 1993; KAMRADT et al., 1996). Impfstudien, in denen rOspA als Impfantigen verwendet wurde, konnte diese Hypothese jedoch nicht

bestätigen. Demnach gab es nach Immunisierung von mehr als 5.000 Probanden keinen Hinweis darauf, dass die Immunisierung bei Patienten mit vorheriger selbst berichteter LB zu einer Exazerbation der klinischen Veränderungen führte. Die im Zusammenhang mit der Antigenapplikation auftretenden Nebenwirkungen waren in den ersten sieben Tagen nach der Immunisierung zu beobachten und umfassten eine Schwellung an der Injektionsstelle, die mit Schmerzen vergesellschaftet waren sowie milde grippeähnliche Erscheinungen. Hierbei handelte es sich um unspezifische Impfreaktionen, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Applikation von rOspA standen (SIGAL et al., 1998; STEERE et al., 1998). Aufgrund sinkender Nachfrage wurde LYMERix™ vier Jahre später wieder vom US-Markt genommen (HANSON & EDELMAN, 2003). Für den Menschen besteht derzeit keine Möglichkeit, sich gegen die LB impfen zu lassen. Für Hunde hingegen stehen diverse kommerziell erhältliche Vakzinen zur Verfügung (TÖPFER, 2007). Alle zugelassenen Impfstoffe sind Totvakzinen, die sich in ihrer Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Während einige Vertreter inaktivierte Vollerreger enthalten, ist das eingesetzte Antigen bei anderen Vakzinen lediglich rekombinantes OspA. In Deutschland sind derzeit zwei Lysat-Vakzinen für Hunde erhältlich. Merilym 3® (Boehringer-Ingelheim-Vetmedica GmbH) enthält die Spezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii*, während Virbagen canis B® (Virbac Tierarzneimittel GmbH) die Spezies *B. garinii* und *B. afzelii* beinhaltet. Seit Juni 2015 ist ein Impfstoff gegen die LB für Pferde erhältlich. Die Lysat-Vakzine EquiLyme® (Boehringer-Ingelheim-Vetmedica GmbH) ist ebenfalls ein Totimpfstoff und enthält die Antigene der Spezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii*. Als Adjuvans fungiert Aluminiumhydroxid. Laut Herstellerangaben kann die Immunisierung eine vorübergehende Erhöhung der Körpertemperatur (bis zu 1,5 °C) des Pferdes hervorrufen. Außerdem sind vorübergehenden Schwellungen an der Injektionsstelle sowie Überempfindlichkeitsreaktionen möglich.

Das Wirkprinzip von allen derzeit verfügbaren Impfstoffen gegen die LB basiert auf der Induktion von spezifischen Antikörpern gegen das OspA der Borrelien. Nach einer Infektion des Säugetieres haben die Borrelien das OspA bereits von ihrer Oberfläche entfernt, weshalb sich die Impfung als Therapie für eine bereits bestehende Borrelieninfektion nicht eignet (ZHONG et al., 1997). Derzeitig wird an der Herstellung von alternativen Impfstoffen gegen die LB gearbeitet. Ein wichtiger Grund dafür stellt die in Europa vorhandene Speziesdiversität von *Bbsl* dar. Bei Impfstoffen, die lediglich rOspA als Impfantigen verwenden, ist die durch Immunisierung induzierte Kreuzreaktivität unzureichend (GERN et al., 1997). Ein weiterer Nachteil beim Einsatz von Vakzinen, die zur Induktion von OspA-spezifischen Antikörpern führen, ist die Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren mittels der serologischen Standarddiagnostik. Obwohl der Antikörper-

nachweis gegen OspA mittels Immunoblot beim Tier als Indikator für eine erfolgte Immunisierung zu verstehen ist (BARBOUR et al., 1983; CRAFT et al., 1984), muss zur Erfassung von immunisierten Tieren mittels ELISA anstelle von Borrelienlysat reines rOspA als Detektionsantigen verwendet werden. Ebenso führt der Einsatz von den Proteinen DbpA und OspC zu Differenzierungsschwierigkeiten von geimpften und infizierten Tieren.

Obwohl Antikörper gegen OspC eine bakterizide Wirkung besitzen und die Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Wirt partiell unterbinden können, existieren derzeit noch keine Daten über die protektive Wirkung gegenüber einer Borrelieninfektion des Pferdes (GILMORE & PIESMAN, 2000; PAL et al., 2004a; HENDERSON, 2005; EARNHART et al., 2007; EARNHART & MARCONI, 2007). Bei der Entwicklung von neuen Impfmechanismen gegen die LB werden vorwiegend Co-Infektionen, die im Zusammenhang mit einer Zeckenexposition einhergehen, berücksichtigt. Die Impfstrategien zielen dabei einerseits auf die Immunisierung von Reservoirwirten, um die Erregerlast in den Zecken zu minimieren, andererseits werden Wirtstiere mittels Antigenen immunisiert, die die Blutmahlzeit der Zecke am Wirt unterbinden (EMBERS & NARASIMHAN, 2013).

Obwohl die Impfung gegen den Erreger der LB eine wichtige und effektive Vorbeugemaßnahme darstellt, ist die tägliche Zeckenkontrolle, sowie die frühestmögliche manuelle Zeckenentfernung unerlässlicher Bestandteil der Infektionsprophylaxe.

2.4 Therapie

Da es sich bei Borrelien um Bakterien handelt, stellt die Antibiotikatherapie im Kampf gegen die LB das Mittel der Wahl dar. Die Behandlung mittels Antibiotika ist erfolgreicher, wenn diese bereits im Frühstadium der LB begonnen wird (ASCH et al., 1994). Erfolgt die Antibiotikabehandlung in den ersten vier Wochen nach Infektionsbeginn, beträgt die Erfolgsquote in humanmedizinischen Patienten 90 %. Dagegen führt der Antibiotikaeinsatz zur Behandlung von chronischen Verlaufsformen in 50 % der Fälle zum Erfolg (DATTWYLER et al., 1988; MANNING, 1989; PREACMURSIC et al., 1989). Die LB des Menschen wird grundsätzlich mit Tetrazyklin-Antibiotika behandelt. Derzeit wird für alle Patienten mit einem EM die Standardtherapie mit Doxyzyklin empfohlen (STUPICA et al., 2012). Alternativ können β -Laktam-Antibiotika eingesetzt werden. Patienten, die an einer Lyme-Meningitis erkrankt sind, können entweder mit Doxyzyklin oder mit Ceftriaxon, einem Cephalosporin-Antibiotikum der dritten Generation, behandelt werden. Für das Krankheitsbild einer LB-Karditis, Lyme-Arthritis, Lyme-Radikulopathie oder einer kraniellen Neuropathie kann die

Therapie ebenfalls mit Doxzyklin oder Ceftriaxon erfolgen (LJOSTAD et al., 2008). Handelt es sich dagegen um eine chronische LB wird eine initiale Behandlung mit Ceftriaxon über zwei Wochen und eine darauffolgende Verabreichung von Doxycyclin über maximal drei Monate empfohlen. Eine darüber hinaus gehende Therapiedauer bringt keine Besserung der Symptome. Dagegen kann es aufgrund der lang anhaltenden Antibiotikaverabreichung zu schweren Nebenwirkungen kommen (BERENDE et al., 2016).

Ebenso wie beim Menschen ist die erfolgreiche Antibiotikatherapie bei Tieren vom Beginn der Behandlung abhängig. Je früher im Krankheitsverlauf mit der Antibiose begonnen wird, umso höher ist die Erfolgsrate. Beim Hund konnte gezeigt werden, dass sich das Krankheitsbild bereits innerhalb der ersten drei Behandlungstagen verbesserte (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Sowohl der Einsatz von β -Laktam-Antibiotika, als auch von Tetrazyklinen führt zu einer Besserung der klinischen Veränderungen einer LB des Hundes. Aufgrund der im Vergleich zu anderen Bakterien längeren Generationszeit der Borrelien ist eine Behandlungsdauer von mindestens 28 Tagen anzuraten (STRAUBINGER et al., 1997a; STRAUBINGER et al., 2000). Eine rechtzeitige, ordnungsgemäße Therapie gewährleistet jedoch keine Erregerfreiheit. In experimentell infizierten, klinisch unauffälligen Hunden, wurden unterschiedliche Therapiemethoden getestet. Während einige Hunde 30 Tage mit einer Dosis von 10 mg/kg Doxzyklin zweimal täglich behandelt wurden, erhielten die anderen Tiere entweder alle acht Stunden 20 mg/kg oral zu verabreichendes Amoxicillin, einmal täglich 25 mg/kg oral zu verabreichendes Azithromycin oder einmal täglich 25 mg/kg Ceftriaxon intravenös. Nach Beendigung der Therapie wurden anhand von Hautbiopsien an der Zeckenexpositionsstelle direkte Nachweisverfahren von *Bbsl* durchgeführt. Sowohl die kulturelle Anzuchtung als auch die PCR waren in einer Vielzahl der Proben positiv. Obwohl der Einsatz von Antibiotika in der Regel zu einer Verringerung der Spirochäten im Gewebe führt, können einige Borrelien überleben und eine persistierende LB verursachen (STRAUBINGER et al., 1998a).

Die Behandlung einer LB des Pferdes erfordert eine strenge Indikationsstellung. Neben einer vorberichtlichen Zeckenexposition und einem positiven serologischen Erregernachweis ist das Vorliegen von klinisch manifesten Veränderungen ein entscheidendes Kriterium für den Antibiotikaeinsatz beim Pferd. Am häufigsten werden beim Pferd Oxytetracyclin und Doxzyklin angewendet (DIVERS, 2013). Obwohl Doxzyklin im Gegensatz zu Oxytetracyclin eine bessere Verteilung im Gewebe gewährleistet, ist Oxytetracyclin durch eine höhere Bioverfügbarkeit gekennzeichnet. Bei intravenöser Applikation von Doxzyklin traten beim Pferd hochgradige kardiovaskuläre Nebenwirkungen bis

hin zu Todesfällen auf (RIOND et al., 1992). In einer von CHANG et al. an Ponys durchgeführten Studie zeigte intravenös verabreichtes Oxytetracyclin eine bessere Wirksamkeit gegen *Bbsl* (CHANG et al., 2005). Beim Pferd sollte dieses Antibiotikum jedoch nicht oral verabreicht werden, da es aufgrund seiner geringen Bioverfügbarkeit schwere Durchfälle auslösen kann, falls aktive Metaboliten das Colon erreichen (WHITE & PRIOR, 1982). Die intravenöse Applikation von Oxytetracyclin erfordert eine genaue Überwachung der Nierenfunktion des Pferdes, da neben einer proliferativen Enteropathie, verursacht durch *Lawsonia intracellularis*, auch die Gefahr für ein akutes Nierenversagen gegeben ist. Zur Behandlung einer LB beim Pferd sollten zweimal täglich 6,6 mg/kg Oxytetracyclin über sieben bis zehn Tage intravenös appliziert werden. Im Anschluss daran wird die orale Verabreichung von 10 mg/kg Doxyzyclin zweimal täglich über ein bis zwei Monate empfohlen (DIVERS, 2013). Ebenso eignet sich eine tägliche intravenöse Verabreichung von 5 mg/kg Oxytetracyclin über einen Zeitraum von 28 Tagen (CHANG et al., 2005). Als alternatives Antibiotikum kann auch Cefquinom intravenös oder intramuskulär in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen verabreicht werden (STRAUBINGER, 2017).

2.5 Diagnostik

Die Diagnose „LB“ erfordert neben einer klinischen Allgemeinuntersuchung in jedem Fall auch eine labordiagnostische Untersuchung von geeignetem Probenmaterial. Während mittels Hautbiopsien, Myocardiopsien, Liquor, Gelenkflüssigkeit und Synoviabiopsien ein direkter Erregernachweis möglich ist, erfolgt der indirekte Nachweis von Borrelien mittels Blutserum und Liquor. Das in der Humanmedizin zu verwendende Probenmaterial ist abhängig von der klinischen Manifestation der LB (ESHOO et al., 2013). Bei Tieren dagegen erfolgt die Diagnose vornehmlich durch einen indirekten Erregernachweis im Blutserum. Hierbei ist es unabdingbar, die labordiagnostischen Ergebnisse im Zusammenhang mit den klinischen Erscheinungen zu interpretieren.

2.5.1 Indirekte Nachweisverfahren von *Bbsl*

BARBOUR et al. (1983) gelang mit der Entwicklung eines indirekten Immunfluoreszenz-Antikörpertests (IFT bzw. IFAT) die erste Methode für die Detektion von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern. Kurze Zeit später etablierte sich auch der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) als Diagnostikinstrument für die LB (RUSSELL et al., 1984). Beide Verfahren zeigten bei Verwendung von humanen Seren eine hohe Sensitivität für späte Stadien der LB, wohingegen die Diagnose von Frühmanifestationen der LB mangels unzureichender Sensitivität Schwierigkeiten bereitet (ESHOO et al., 2013). Zudem

zeigten beide Nachweismethoden eine hohe Kreuzreaktivität mit anderen durch Spirochäten verursachten Erkrankungen (RUSSELL et al., 1984). In der Humanmedizin reagieren die *Bbs*-spezifischen Antikörper vornehmlich mit Oberflächenantigenen von *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis, sowie auch mit Proteinen von Leptospiren. Weiterhin können die Antikörper auch mit den Rückfallfieber-Borrelien, wie *B. recurrentis* und *B. duttoni* kreuzreagieren (MAGNARELLI & ANDERSON, 1987; ESHOO et al., 2013). Abgesehen davon werden der ELISA und der IFT auch heute noch für die Serodiagnostik der LB verwendet. Der Immunoblot hat sich ebenfalls als indirektes Nachweisverfahren einer LB bewährt (FINGERLE & WILSKE, 2007).

Beim Tier erfolgt der Nachweis einer Borrelieninfektion vorwiegend über serodiagnostische Verfahren. Hierbei wird eine zweistufige Diagnostik empfohlen, die aus einem Suchtest und einem Bestätigungstest besteht. In der ersten Stufe der Diagnostik wird anhand einem ELISA oder IFT nach *Bbsl*-spezifischen Antikörpern gesucht. Anschließend wird die Borrelieninfektion durch einen Immunoblot bestätigt (JOHNSON et al., 1996; WILSKE et al., 2001). Beim Pferd werden als Borrelien-Nachweisverfahren der ELISA und der Line immunoassay (LIA) eingesetzt. Da es bei Pferden häufiger zu Kreuzreaktionen zwischen *Bbsl*-spezifischen Antikörpern und Leptospiren-Antigenen kommt, muss dies bei der Auswertung der serologischen Testergebnisse berücksichtigt werden.

2.5.1.1 Immunfluoreszenztest (IFT)

Während der direkte IFT für den Nachweis von Antigenen dient, wird der indirekte IFT zum Antikörpernachweis verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert darauf, dass Fluorochrom-Moleküle in einem ersten Schritt energetisch angeregt werden. Beim Wechsel in den ursprünglichen Zustand senden diese Moleküle Strahlung einer Wellenlänge aus, die im sichtbaren Bereich liegt und fluoreszenzmikroskopisch gemessen werden kann (SELBITZ et al., 2011). In der Borreliendiagnostik beim Pferd wird das zu untersuchende Serum auf einen Objektträger aufgetragen, der zuvor mit bestimmten inaktivierten Borrelienspezies beschichtet wurde (MAGNARELLI & ANDERSON, 1987). Befinden sich in den Serumproben spezifische Antikörper gegen *Bbsl*, binden diese an die Oberflächenantigene der Borrelien und es entstehen Antigen-Antikörperkomplexe. Anschließend werden Sekundärantikörper aufgetragen, die einerseits mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden und andererseits gegen Pferde-Antikörper gerichtet sind. Das Resultat ist eine Fluoreszenz, dessen Intensität proportional zur Menge der im Serum vorhanden borrelienspezifischen Antikörper sind. Da der IFT subjektiv ausgelesen wird und häufig Kreuzreaktionen stattfinden, sollte diese Methode nicht in der Routinediagnostik eingesetzt werden (BARTH et al., 2014).

2.5.1.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist die am häufigsten verwendete Nachweismethode für Antikörper gegen *Bbsl*. Hierbei wird eine Mikrotiterplatte mit Borrelienantigenen beschichtet. Dabei kommen sowohl Lysate von *Bbsl*, welche in einer Kultur angezüchtet werden, als auch rekombinante Proteine zum Einsatz (MAGNARELLI et al., 1997). Anschließend werden die zu untersuchenden Seren in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Nach ausreichender Inkubationszeit werden mittels Waschvorgängen unspezifische Bindungen zwischen den Borrelienantigenen und der im Serum vorhandenen Antikörper entfernt. Durch Zugabe eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers kann die Konzentration der gegen *Bbsl* gerichteten Antikörper ermittelt werden. Dies gelingt durch Zugabe eines Substrates, welches analog zum Gesamtgehalt an spezifisch gebundenen Antikörpern mit einem Farbumschlag reagiert. Die Extinktion wird mit einem speziell für Mikrotiterplatten geeignetem Photometer gemessen (KRAMER et al., 1992). Wird Borrelienlysate als Detektionsantigen verwendet, so können die Antikörper weder ihrer Größe nach differenziert werden noch können Aussagen über die Oberflächenproteine gemacht werden, gegen die sie gerichtet sind. Des Weiteren werden bei Durchführung eines ELISA sowohl Antikörper erfasst, die aufgrund einer Immunisierung oder einer Infektion gebildet wurden. Damit die durch Impfung induzierten Antikörper ermittelt werden können, muss reines rekombinantes OspA als Antigen eingesetzt werden um sicher zu stellen, dass keine unspezifischen Bindungen stattfinden. Bei Verwendung eines ELISA in der Borreliendiagnostik sollten zweifelhafte Serumproben mit Hilfe eines zusätzlichen Testverfahrens nachuntersucht werden. Hierfür eignet sich der Immunoblot. Die Spezifität des ELISA kann insbesondere durch den Einsatz von den rekombinanten Antigenen p37 und VlsE verbessert werden (AGUERO-ROSENFELD et al., 2005; MAGNARELLI & FIKRIG, 2005).

Der Kinetic-ELISA (KELA) stellt eine Modifikation des ELISA dar. Beim KELA werden zur Erfassung der Kinetik der Immunkomplexbildung in einer vorgegebenen Zeitspanne computergestützt dynamische Messungen der Extinktion durchgeführt. Die Rate an gemessener Enzym-Substrat-Reaktion ist proportional zur Antikörperkonzentration in der Serumprobe (TSANG et al., 1980). Die erfolgreiche Detektion von Antikörpern gegen *Bbsl* in Hundeseren wurde in der Cornell University (Ithaca, New York, USA) protokolliert (SHIN et al., 1993) und anschließend erprobt (CHANG et al., 1995). Basierend auf diesem Protokoll wird die erfolgreiche Anwendung des KELA für die Antikörperdetektion in Pferdeseren in zwei experimentellen Infektionsversuchen von Ponys beschrieben (CHANG et al., 1999; CHANG et al., 2000).

Neben dem konventionellen ELISA eignet sich der IDEXX SNAP® 4Dx® Test für die

sofortige Detektion von Antikörpern gegen *Bbsl*. Dieses Verfahren wurde für den Einsatz beim Hund entwickelt und zeichnet sich durch die Verwendung des C6-Peptids aus. Dieses Protein ist Teil der nicht variablen Regionen (IR1-6) innerhalb des variablen Oberflächenproteins VlsE. Antikörper gegen das VlsE-Antigen sind hochspezifisch für eine Infektion mit *Bbsl* und ermöglichen die Differenzierung von infizierten und geimpften Tieren (O' CONNOR et al., 2004). JOHNSON (2008) et al. evaluierte dieses Testsystem für den Nachweis von spezifischen Antikörpern beim Pferd und kam zu dem Ergebnis, dass dieses Nachweisverfahren mit einer Sensitivität von 63 % und einer Spezifität von 100 % auch für Pferde eingesetzt werden kann. Die Detektion von Antikörpern gegen das C6 dient unter Praxisbedingungen zum Nachweis einer akuten Borrelienerkrankung.

2.5.1.3 Immunoblot

Der Immunoblot dient zum semiquantitativen Nachweis von Antikörpern gegen *Bbsl*. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die humorale Immunantwort genauer differenziert werden. Somit können durch Infektionen induzierte Antikörper von Impfantikörpern unterschieden werden. Derzeit wird im Hinblick auf die Diagnose der LB sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin der Zweistufentest empfohlen (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 1995; JOHNSON et al., 1996; WILSKE et al., 2001). Bei positivem Ergebnis des ELISA oder IFT, dient der Immunoblot als Bestätigungstest für eine Borrelienerkrankung (BROUQUI et al., 2004; WILSKE et al., 2007; HALPERIN, 2011; ROBERT-KOCH-INSTITUT, 2013). Im Gegensatz zu Ganzzell-Lysat-Blots, weisen Immunoblots mit rekombinanten Antigenen eine höhere Sensitivität auf. Bei Verwendung von rekombinanten Antigenen können spezifische Antigene selektioniert werden und das Problem der Unterscheidung von unspezifischen, benachbarten Antigen-Antikörper-Komplexen entfällt. Außerdem können auch Antigene wie DbpA und VlsE, die nur in vivo und nicht in Kultur exprimiert werden, als Detektionsantigene verwendet werden (SCHULTE-SPECHTEL et al., 2003). Ein weiterer Vorteil beim Einsatz von rekombinanten Antigenen ist die einfachere Standardisierung und die zuverlässigere Auswertung der Immunoblots.

2.5.1.3.1 Western-Blot

Beim Western-Blot werden Antigene von *Bbsl* mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und auf eine feste Trägermembran übertragen. Häufig handelt es sich hierbei um eine Nitrozellulosemembran. Nachdem die Proteine auf dem Trägerstoff gebunden sind, wird im nächsten Schritt die zu untersuchende Serumprobe aufgetragen. Sind Antikörper gegen die Borrelianti-

gene vorhanden, entstehen spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe. Mit Hilfe von enzymmarkierten speziesspezifischen Sekundärantikörpern können diese Bindungen sichtbar gemacht werden, indem eine Farbreaktion in einer Intensität stattfindet, die analog zur Menge der im Serum vorhandenen Antikörper ist. Das Resultat dieses semiquantitativen Testverfahrens ist ein Bandenmuster, welches mit einem Größenmarker interpretiert werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, einzelne Banden den jeweiligen Borrelienantigenen zuzuordnen und damit speziesspezifische Antikörper aufzuspüren.

2.5.1.3.2 Line immunoassay (LIA)

Der Line immunoassay (LIA) stellt eine Weiterentwicklung des kommerziellen Western-Blots dar. Dabei werden die Erregerantigene durch ein spezielles Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran gesprüht. Im nächsten Schritt wird die Trägermembran in Einzelstreifen geschnitten. Die nachfolgende Testdurchführung erfolgt analog zum Western-Blot. Durch die Etablierung des LIA konnte die Sensitivität deutlich verbessert werden. Dies liegt einerseits daran, dass dadurch zusätzliche Antigene getestet werden können, andererseits kann mittels LIA die Immunreaktivität für jedes einzelne Protein mit gleichem Molekulargewicht separat beurteilt werden (FINGERLE & WILSKE, 2007). Ein Zugewinn der Spezifität dieses Testverfahrens wird durch den Einsatz von rekombinanten Antigenen erreicht, indem eine Vielzahl von Antigenen unterschiedlicher Borrelienspezies mit diagnostischem Stellenwert auf einen Streifen aufgebracht werden können (GOETTNER et al., 2005). Damit die Auswertung des LIA standardisiert durchgeführt werden kann, haben die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Immunoblot-Kriterien erstellt, die in der humanmedizinischen LB-Diagnostik in den USA verwendet werden (HAUSER et al., 1997). In Deutschland haben Experten Interpretationsregeln erarbeitet und in der DIN 58969-44 veröffentlicht (DIN DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG E.V., 2005). Bei der Auswertung des Testergebnisses müssen die klinischen Daten Berücksichtigung finden. Beim Menschen lassen sich Antikörper zwei bis vier Wochen nach einer Infektion mit *Bbsl* mittels Immunoblot nachweisen. Dabei sind Quantität und Qualität der Antikörperproduktion abhängig vom Krankheitsstadium der LB. Während in der frühen, lokalisierten Phase (EM) lediglich 20-50 % der Patienten seropositiv für IgM und/oder IgG-Antikörper sind, weisen in der frühen, disseminierten Phase (Neuroborreliose) 70-90 % der Betroffenen IgM und/oder IgG-Antikörper auf. Im späten Krankheitsstadium (ACA und Arthritis) können dagegen bei allen Patienten IgG-Antikörper detektiert werden (HANSEN et al., 1988; HANSEN & ASBRINK, 1989). Richtet man ein Augenmerk auf die Antikörperqualität, so sind im frühen Krankheitsstadium vornehmlich Antikörper gegen p41 und OspC detektierbar (SIMPSON et al., 1991). Bei Patienten mit Spätmanifestationen der LB sind dagegen IgG-Antikörper nachzuweisen,

die gegen ein breites Spektrum von Antigenen gerichtet sind. Nach DIN 58969-44 (2005) werden Antikörper gegen die Antigene p83/100, p58, VlsE, p43, p41, p39, p30, OspC, p21, DbpA (Osp17) und p14 als spezifische Immunreaktion in Folge einer Infektion mit *Bbsl* gewertet. Dabei gilt das Erscheinen von mindestens zwei Banden bei den genannten Proteinen als positives Testergebnis. Dagegen stufen ZÖLLER et al. (1993) die Proteine p83/100, p39, OspA und OspC als hochspezifisch ein und schreiben ihnen damit einen hohen Stellenwert in der Diagnostik einer LB zu.

Für die Auswertung des Immunoblots beim Pferd sind bislang keine einheitlichen Interpretationskriterien vorhanden. Dies liegt daran, dass die Kenntnisse hinsichtlich der Produktion von spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Antigene in Folge einer Borrelienerkrankung unzureichend sind. CHANG et al. (2000) führte in New York eine Infektionsstudie mit sieben Ponys durch. Durch Zeckenexposition wurden die Pferde mit *Bbss* infiziert. Anschließend erfolgten über einen Zeitraum von neun Monaten in zweiwöchigen Intervallen Blutprobenentnahmen. Die gewonnenen Seren wurden mittels Immunoblot untersucht. Dabei konnten vornehmlich spezifische Antikörper gegen die Proteine p83, p65, p60, p41 und p39 detektiert werden. Darüber hinaus konnten schwach gefärbte Banden bei den Antigenen mit einem Molekulargewicht von 28 kDa, 30/31 kDa, 35 kDa und 45 kDa beobachtet werden. MÜLLER und Mitarbeiter (2002) analysierten mit dem Immunoblot Pferdeseren aus Österreich hinsichtlich Antikörper gegen *Bbss*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae*. Hierbei konnten 27 Banden detektiert werden, die Proteine von einem Molekulargewicht von 9 kDa bis 83/100 kDa umfassten. Da bei allen Genospezies Antikörper gegen die Proteine p83/100 und p41 detektiert werden konnten, lässt sich darauf schließen, dass diese Antigene beim Pferd Kreuzreaktionen induzieren.

MANION et al. (2001) führten in Connecticut eine serologische Untersuchung von 22 Pferden mit klinischen Erscheinungen einer LB durch. Bei 77 % der untersuchten Seren konnten mit Hilfe des Immunoblots Antikörper gegen die Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 kDa, 31 kDa, 34 kDa, 45 kDa und 83/93 kDa nachgewiesen werden.

Dzierzecka und Mitarbeiter (2002) untersuchten 87 Pferdeseren mittels ELISA und Western-Blot hinsichtlich einer Borrelienerkrankung. Bei den ELISA-positiven Proben zeigte der Immunoblot ein Signal bei den Proteinen mit einem Molekulargewicht von 41 kDa, 62/60 kDa, 93 kDa, 72 kDa, 34 kDa und 66 kDa. Dagegen reagierten auch 55,5 % der ELISA-negativen Proben mit dem Antigen p41, sodass eine Antikörperproduktion gegen dieses Antigen eher als unspezifisch anzusehen ist und in der Borreliendiagnostik einen geringen Stellenwert einnimmt.

Nachdem KRUPKA und Mitarbeiter (2012) 149 Pferde mittels Immunoblot serologisch auf Anzeichen einer LB untersucht haben, konnten bei positiv befundeten Proben häufig

Immunreaktionen bei VlsE-Mix, DbpA-Mix und p83 beobachtet werden. Eine Antikörperdetektion gegen OspC und OspA ist dagegen als unspezifisch anzusehen, da Pferde auf eine Impfung vornehmlich mit einer Antikörperproduktion gegen OspA reagieren (KRUPKA et al., 2012)

2.5.2 Direkte Nachweisverfahren von Bbs/

2.5.2.1 Mikroskopie und Kultivierung

Die mikroskopische Untersuchung bietet die Möglichkeit, Borrelien direkt darzustellen. Dadurch können Größe, Gestalt, Beweglichkeit und Anfärbbarkeit beurteilt werden. Für die Untersuchung kann entweder ein Dunkelfeldmikroskop oder ein Phasenkontrastmikroskop eingesetzt werden. Allerdings ist die mikroskopische Darstellung der Spirochäten schwierig, da die Anzahl der Mikroorganismen im infizierten Gewebe oftmals unter der Nachweisgrenze von $10^4 - 10^5$ Keimen/ml liegt. Durch die Erfassung der mikroskopischen Eigenschaften können zudem keine Artdiagnosen gemacht werden. Dazu müssen weitere Verfahren, wie die serologische Untersuchung und die Fluoreszenzmikroskopie, angewendet werden.

Die kulturelle Untersuchung auf Borrelien ermöglicht die zuverlässige Diagnose einer LB. Obwohl der kulturelle Erregernachweis aus Probenmaterial bis zu sechs Wochen dauert (STRAUBINGER et al., 1997a) und deshalb routinemäßig nicht als alleiniges Nachweisverfahren eingesetzt werden kann, gelingt mit der kulturellen Anzucht eine weitere Charakterisierung der Borrelienisolate (WILSKE et al., 2007; MARQUES, 2015). Neben Synovialflüssigkeit, Cerebrospinalflüssigkeit und Blut sind Hautbiopsien und Proben aus der Synovialmembran am besten für die kulturelle Erregeranzucht geeignet (BERGER, 1992). Das Gewebe wird anschließend in ein Nährmedium verbracht. Heute werden vorwiegend die Nährmedien Barbour-Stoener-Kelly II (BSK II) (BARBOUR, 1984), BSK-H (POLLACK et al., 1993), und Kelly Medium Preac-Mursic (MKP) (PREAC-MURSIC et al., 1986) eingesetzt, da sie den Erregern optimale Wachstumsbedingungen bieten können. Dies zeigt sich vor allem in Form von kürzeren Generationszeiten und maximalen Konzentrationen der Spirochäten von bis zu 10^9 Keimen/ml. Die Inkubation erfolgt unter mikroaerophilen Bedingungen bei einer Temperatur von 30°C bis 34°C über einen Zeitraum von bis zu zwölf Wochen, da Borrelien im Gegensatz zu anderen Bakterien eine längere Generationszeit (18 - 24 Stunden) in Anspruch nehmen (BARBOUR, 1984). Während dieser Zeitspanne wird ein Aliquot der Kultur in regelmäßigen Abständen mittels Dunkelfeld- oder Phasenkontrastmikroskopie auf die Spirochäten untersucht. Die kulturelle Untersuchung kann durch unzureichende Erfahrung bei der mikroskopischen Detektion zu falsch-

positiven Ergebnissen führen. Sofern sich in der Kultur Borrelien nachweisen lassen, ist es möglich, die Isolate mittels nachfolgender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu differenzieren.

2.5.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) ermöglicht die in-vitro-Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragmentes durch eine Taq-Polymerase. Diese Methode erlaubt eine schnelle und effiziente Vermehrung von kleinsten Nukleinsäuremengen und hat damit einen hohen Stellenwert im Hinblick auf den direkten Nachweis des Erregers. Da dieses Verfahren keine Quantifizierung der spezifischen Nukleinsäuremenge im Testmaterial ermöglicht, stellt die Real-Time-PCR eine Alternative dar. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt, die die Auftrennung der Amplifikationsprodukte mit Hilfe der Gelelektrophorese und der anschließenden Anfärbung ersetzen. Des Weiteren ist mittels Fluoreszenzmessung bei jedem Reaktionszyklus eine Quantifizierung der Zielsequenz im Probenmaterial möglich. Die PCR ist ein sensitives und spezifisches Verfahren zur direkten Detektion des Erregers der LB beim Menschen (ROSA und SCHWAN, 1989). Obwohl Hautbiopsien am häufigsten für die PCR-Reaktion verwendet werden, können auch Körperflüssigkeiten wie Blut, Cerebrospinal- oder Synovialflüssigkeit als Probenmaterial fungieren. Im Gegensatz zur kulturellen Anzucht des Erregers handelt es sich bei der PCR um ein schnell durchführbares Diagnostikverfahren. Dennoch ist diese Methode mit einigen Schwierigkeiten behaftet. Die Sensitivität der PCR ist zu einem großen Teil von der Probenentnahme und -aufbewahrung abhängig. Einerseits muss die entnommene Gewebeprobe eine ausreichende Anzahl von Borrelien aufweisen, andererseits führt die Kultivierung einer Hautbiopsie in BSK-Medium zwar zu einer höheren Amplifikationsrate der Borrelien, jedoch gilt hierbei zu beachten, dass Borrelien von der Haut in das Nährmedium auswandern können und somit auch das Nährmedium mittels PCR untersucht werden muss. Des Weiteren können sowohl die Wirts-DNA also auch Inhibitoren im Probenmaterial die PCR-Detektion von *Bbsl* negativ beeinflussen. Eine weitere Hürde stellt die DNA-Extraktion aus dem gewonnenen Probenmaterial dar. Da sich durch den Extraktionsprozess die Probenmenge verringert, kommt es in der Folge auch zu einer Reduktion der nachweisbaren Borrelien-DNA. Schließlich wird das Ergebnis des Amplifikationsverfahrens stark von den für die PCR-Reaktion verwendeten Primern und Zielsequenzen beeinflusst.

AGUERO-ROSENFELD und Mitarbeiter (2005) beurteilen die Sensitivität der PCR zur direkten Erregerdetektion lediglich bei Verwendung von Hautbiopsien als ausreichend, während bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten andere Nachweisverfahren in

Betracht gezogen werden sollten. Bei Tieren gestaltet sich die PCR schwieriger, da Borrelien enthaltende Hautareale durch Pigmentierung und starke Behaarung nicht in jedem Fall aufgefunden werden können. Daher ist ein negatives PCR-Ergebnis keinesfalls ein Ausschlusskriterium für das Vorhandensein von *Bbsl*. Ein positiver Erregernachweis ist dagegen ein eindeutiger Beweis für eine bestehende Borrelieninfektion. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollte der Erregernachweis mittels PCR laut FINGERLE (2015) nur in spezialisierten Laboren durchgeführt werden.

3 Pferde, Material und Methoden

3.1 Pferde

Zur Durchführung dieser Feldstudie erfolgte bei der Regierung von Oberbayern eine Tierversuchsanzeige, die unter dem Aktenzeichen Az. 55.2.1.54-2532.0-91-16 geführt wird. Insgesamt wurden 194 Pferde aus Privathaltungen und einem Gestüt in Bayern untersucht. Die Auswahl der Tiere erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Das Alter der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung zwischen sechs Monaten und 25 Jahren. Daneben waren die Pferde unterschiedlichen Rassen und Geschlechtern zugehörig. Nach Durchführung einer allgemeinen und serologischen Untersuchung auf *Bbsl*-spezifische Antikörper mittels KELA und LIA wurden 168 negativ und schwach grenzwertig getestete Pferde in die Studie aufgenommen. Nachdem die Pferdebesitzer darüber aufgeklärt wurden, dass die Pferde über einen Zeitraum von 13 Monaten für die Studie zur Verfügung gestellt und in regelmäßigen Abständen geimpft und serologisch untersucht werden müssen, stimmten die Besitzer von 143 Pferden den Teilnahmebedingungen zu. Während dem Studienzeitraum kam es zum Abgang von 13 Tieren. Drei Pferde starben an einer Kolik, zwei Stuten mussten aufgrund von schweren Geburtsverletzungen euthanasiert werden, drei Tiere wurde wegen einer schweren Allgemeinerkrankung, die nicht im Zusammenhang mit der Impfung stand, aus der Studie herausgenommen und weitere fünf Pferde wurden verkauft und waren für Impfungen und serologische Untersuchungen nicht mehr erreichbar. Letztendlich konnte die Studie mit einer Population von 130 Pferden beendet werden. Siebenundachtzig Pferde wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei unterschiedliche Impfschema-Gruppen eingeteilt und regelmäßig geimpft sowie serologisch untersucht. Dreiundvierzig Tiere wurden nicht immunisiert und dienten als Kontrollgruppe zur Ermittlung des Impferfolges. Innerhalb der Impfgruppe A (siehe 3.2), wurde bei drei Stuten zwölf Monate nach der Grundimmunisierung keine weitere Booster-Impfung vorgenommen, da sie zu diesem Zeitpunkt trächtig waren und das Risiko für einen drohenden Abort nicht in Kauf genommen wurde. Ein Hengst, der sich in einem schlechten Allgemeinzustand befand, wurde nach zwölf Monaten ebenfalls nicht mehr geimpft. Diese vier Tiere wurden jedoch für die letzte Blutentnahme zur Verfügung

gestellt und konnten somit serologisch untersucht werden. Nach Beendigung der Studie befanden sich alle untersuchten Pferde in einem guten Allgemeinzustand.

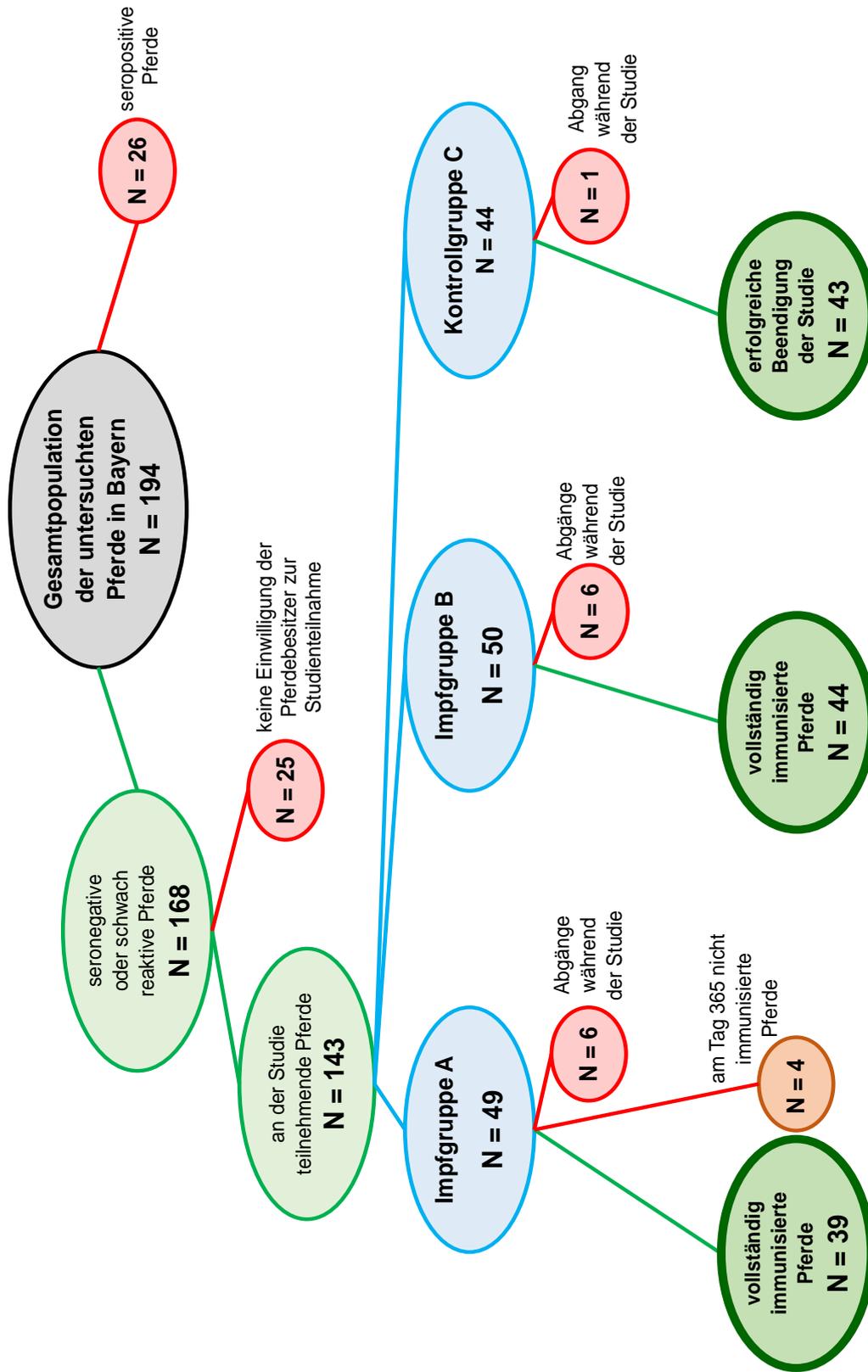


Abbildung 3
Übersicht über die Verteilung der Pferde auf die einzelnen Gruppen

Einhundertfünfundzwanzig Tiere waren in Privatbesitz und wurden in Niederbayern gehalten. Davon befanden sich 57 Pferde im Landkreis Regen, 23 Tiere stammten aus dem Landkreis Deggendorf und 45 Pferde wurden im Landkreis Passau gehalten. Fünf Pferde waren in Besitz eines Gestütes im Landkreis Schwandorf in der Oberpfalz. Insgesamt nahmen 80 weibliche und 50 männliche Tiere an der Studie teil, wobei 54 % der männlichen Tiere kastriert waren. Der Anteil der Warmblutpferde an der Gesamtpopulation lag bei 66,2 %, 11,5 % der Tiere waren Kaltblutpferde, 10,8 % waren Ponys, bei 7,7 % der Pferde handelte es sich um Haflinger und der Anteil der Friesen lag bei 3,8 %.

Tabelle 2: Übersicht über die Herkunft und Anzahl der Pferde

Herkunft	Vollst. Teilnahme an der Studie	Keine Immunisierung nach 12 Monaten	Abbruch der Studie
Landkreis Regen	57	1	4
Landkreis Passau	45	3	7
Landkreis Deggendorf	23		
Landkreis Schwandorf	5		2
Gesamtzahl	130	4	13

3.2 Impfstoff, Impfschema und Blutentnahmeintervalle

Die Immunisierung der Tiere wurde mit der Vakzine EquiLyme® der Fa. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH (Deutschland) durchgeführt. Die Zulassung von EquiLyme® erfolgte am 16.06.2015 durch das Paul-Ehrlich-Institut (Zulassungs-/Reg-Nr. (AMG76): PEI.V.11736.01.1). Hierbei handelt es sich um den ersten und weltweit einzig kommerziell erhältlichen Impfstoff gegen die LB des Pferdes. Eine Dosis (1 ml) der Lysatvakzine enthält die Erreger *Bbss*, *B. afzelii* und *B. garinii* in inaktivierter Form. Als Adjuvans fungiert Aluminiumhydroxid. Die Injektion von einer Dosis EquiLyme® erfolgte intramuskulär in den *Musculus pectoralis*.

Aus der Abbildung 3 ist ersichtlich, dass die Pferdepopulation in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt wurde. Die Pferde in der Gruppe A wurden, der derzeitigen Impfempfehlung entsprechend, zweimal im Abstand von 14 Tagen immunisiert und erhielten zwölf Monate später eine Booster-Impfung. Die Tiere in der Gruppe B erhielten neben der zweimaligen Antigenapplikation innerhalb von 14 Tagen und der Auffrischungsimpfung nach zwölf Monaten sechs Monate nach der Grundimmunisierung eine zusätzliche Antigenverabreichung. Bei der Gruppe C hingegen handelt es sich um eine Kontrollgruppe, die nicht geimpft wurde. Zur Beurteilung des Impferfolges fanden in zweimonatigen Intervallen serologische Untersuchungen statt.

Die erste Blutentnahme erfolgte bei allen Tieren zum Zeitpunkt der ersten Antigenapplikation der Pferde innerhalb der Gruppen A und B, um den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 zu bestimmen. Zwei Wochen nach der ersten Impfung wurden die Tiere in den Gruppen A und B ein weiteres Mal immunisiert. Achtundzwanzig Tage nach der ersten Immunisierung wurde den Pferden erneut Blut entnommen. Im weiteren Verlauf wurden alle Tiere im zweimonatigen Intervall serologisch auf Antikörper gegen *Bbs1* untersucht. Die letzte Blutprobenentnahme fand bei allen Pferden 28 Tage im Anschluss an die Booster-Impfung, die 365 +/- 3 Tage nach der Erstimmunisierung durchgeführt wurde, statt. Am Ende des Untersuchungszeitraumes umfassten die Gruppen A und C jeweils 43 Pferde, wobei vier Tiere in der Gruppe A zwölf Monate nach der ersten Antigenapplikation keine Auffrischungsimpfung erhielten. In der Gruppe B konnten bis zur Beendigung der Studie 44 Pferde regelmäßig geimpft und serologisch untersucht werden.

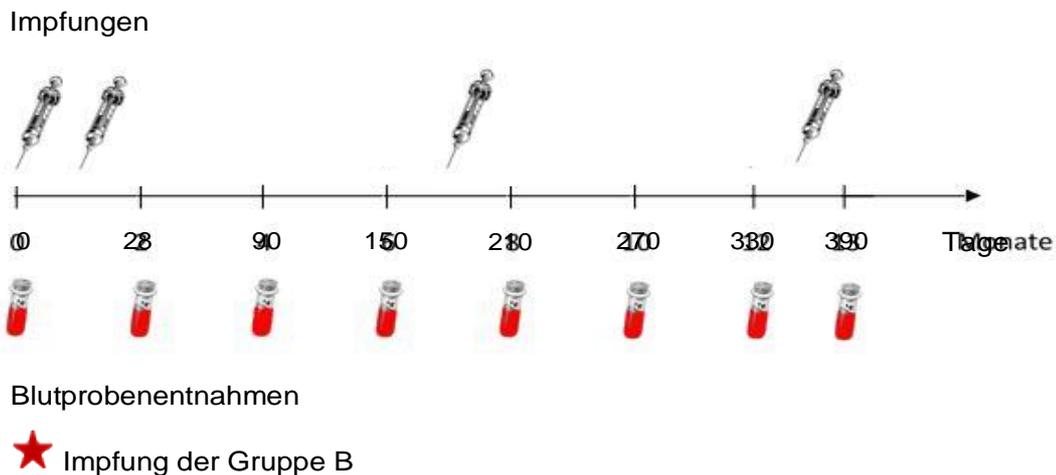


Abbildung 4

Zeitliche Abfolge der Blutprobenentnahmen und Impfungen der Pferde

3.3 Vorgehensweise zur Immunisierung und Blutentnahme

3.3.1 Impfung

Die Impfstoffapplikation erfolgte nach Durchführung einer allgemeinen Untersuchung und Ermittlung der Impftauglichkeit des Pferdes entweder in den rechten oder linken *Musculus pectoralis*. Dafür wurde zunächst der Hautbezirk an einer dieser Stellen gründlich gereinigt und mittels Octenisept (Sarstedt Artikelnr. 114349) desinfiziert. Im Anschluss daran wurde die Vakzine mit 2-ml-Einmal-Spritzen und Kanülen der Größe 22 G (0,70 mm Durchmesser) der Fa. Terumo (Artikelnr. 100097) intramuskulär injiziert.

3.3.2 Blutentnahme

Für die Blutentnahme wurden Serum-Monovetten Z-Gel mit 9 ml Fassungsvermögen und die dazugehörigen Multi-Adaptoren verwendet (Sarstedt Artikelnr. 02.1388.001 und 14.1205). Kanülen mit 1,20 mm Durchmesser und 40 mm Länge dienten zur Punktion der Vene (Henry Schein Artikelnr. 9003625). Nach Adaptation der Kanülen und Multi-Adaptoren auf die Serum-Monovetten wurde zur Vorbereitung der Blutentnahme zunächst der Hautbezirk gründlich gereinigt und mittels Octenisept desinfiziert (Sarstedt Artikelnr. 114349). Die Venenpunktion erfolgte entweder an der linken oder der rechten *Vena jugularis* des Pferdes. Hierfür wurde das Tier vom Besitzer mittels Halfter und Führstrick fixiert. Im nächsten Schritt wurde mit dem linken Daumen die Drosselrinne aufgesucht und die Vene mittels Druckausübung im oberen Halsdrittel angestaut. Im Anschluss wurde die *Vena jugularis* mit der rechten Hand unter fortwährender Anstauung kopfwärts in einer Einstichwinkelung von 45° punktiert. Nach Füllung der Serum-Monovette wurde der Venenstau aufgelöst und die Vene kopfwärts der Einstichstelle erneut angestaut. Schließlich wurde die Kanüle aus der Vene entfernt und die Entnahmestelle mittels Tupfer gut abgedrückt. Sobald keine Nachblutungen mehr erkennbar waren, wurde der Tupfer entfernt und die Fixation des Pferdes gelöst.

3.4 Blutaufbereitung und -konservierung

Die mit Blut gefüllten Serum-Monovetten wurden abhängig vom Ort der Blutentnahme nach maximal sechs Stunden für mindestens 30 min bei Raumtemperatur aufrecht gelagert. Nachdem die Koagulation stattgefunden hat, wurde das Pferdeblut mit der Tischzentrifuge EBA 200 der Firma Hettich bei Raumtemperatur und 10.000 × g für 10 Minuten zentrifugiert (Henry Schein Artikelnr. 523497). Danach wurde von jeder Probe 1,5 ml Serum in 2-ml Mikro-Schraubröhren abpipettiert (Sarstedt Artikelnr. 72.609.001). Nach luftdichtem und auslaufsicherem Verschluss mit dem dazugehörigen Schraubverschluss inklusive Dichtungsring (Sarstedt Artikelnr. 65.716.999) wurden die Mikro-Schraubröhren ordnungsgemäß beschriftet und bei -20 °C eingefroren.

3.5 Kontrollseren, monoklonale Antikörper und rekombinantes OspA

Für die Untersuchung der gewonnenen Serumproben mittels KELA standen verschiedene Kontrollseren zur Verfügung. Darunter waren vier Hundeseren und ein Pferdeserum, für die standardisierte Werte vorlagen. Die Serumprobe A95-13/4 stammte aus SPF-Hunden, die negativ auf das Vorhandensein von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern ge-

testet wurden. Die Probe RKS-B-9826-C wurde aus einem mittels Zeckenexposition experimentell mit *Bbss* N40 infizierten Hund gewonnen. Das Hundeserum Hugo06 stammte aus einem Beagle, der zweimal mittels Lyme Vax®, einem die Spezies *Bbss* enthaltenden Lysat-Impfstoff, immunisiert wurden. Das Serum Lilly06 wurde aus einem dreimalig mittels der Vakzine Lyme Vax® immunisierten Beagle gewonnen. Bei dem Pferdeserum RKS-B-0496-E handelt es sich um eine hoch positive Kontrollprobe. Damit eine Aussage über die nach Impfung vorhandenen Antikörper gemacht werden konnte, wurden die ELISA-Platten neben Borrelien-Lysat zusätzlich mit Recombitek® Lyme der Firma Merial (Charge: 42147 Exp 04/02/11) beschichtet. Hierbei handelt es sich um einen für Hunde entwickelten Impfstoff, der als Antigen rekombinantes OspA der Genospezies *Bbss* beinhaltet. Durch die Bereitstellung von rekombinantem OspA der Stämme *Bbss* ZS7, *B. garinii* ZQ1 und *B. afzelii* PKo seitens Prof. Dr. Kraiczy aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Frankfurt, war es uns ferner möglich, die ELISA-Platten ausschließlich mit reinem rekombinanten OspA zu beschichten.

3.6 Bakterienspezies für die in-vitro-Diagnostik

Für den *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörpernachweis diente die Genospezies *Bbss* N40 (Cornell University, Ithaca, USA). Die Borrelien wurden zunächst in ihrem Medium bei 33 °C und 5 % O₂ im Brutschrank kultiviert. Nach Erreichung einer Dichte von 10⁷ bis 10⁸ Borrelien/ml wurde Glycerol (Sigma, Bestellnr. G 5150) bis zur Endkonzentration von 15 % je ml hinzugegeben. Schließlich wurden jeweils 100 oder 200 µl dieser Lösung in 0,5-ml Eppendorf Gefäße (Safe-Lock, Bestellnr. 0030121.023) pipettiert und bei -80 °C bis zur Verwendung eingefroren.

3.7 Herstellung der Antigenpräparation für die Verwendung im KELA

3.7.1 Herstellung des Kultivierungsmediums für Bbss

Als Nährmedium für die Anzucht von *Bbss* wird BSK II verwendet.

Tabelle 3: Zusammensetzung des BSK II-Mediums

Inhaltsstoff	Firma / Bestellnummer	Charge	Menge
Destilliertes Wasser			900 ml
Bovines Serumalbumin	Sigma A 9056	070K09011	50,0 g
Neopepton	Difco 211681	0297001	5,0 g
HEPES	Sigma H 3784	119H5422	6,0 g
Natriumcitrat	Sigma S 441	99H0075	0,7 g
Glucose	Sigma G 6152	121K0002	5,0 g
Natriumpyruvat	Sigma P 4562	092K15311	0,8 g
N-Acetyl-D-Glucosamin	Sigma A 3286	59H07146	0,4 g
Natriumbikarbonat	Sigma S 5761	85H1110	2,2 g
TC Yeastolate	Difco 255772	139850	2,6 g
CMRL Medium 1066 10 x	Gibco 21540-026	3079826	100 ml
Kaninchenserum	Sigma R 7136	21K8417	64 ml
Kanamycin 80 µl/100ml	Sigma K 0129	52K2322	932 µl
Gelatine	Sigma G 9391	112K1369	14,4 g in 100 ml H ₂ O

Für die Herstellung von 1.164 ml Kultivierungsmedium wurde zunächst bovines Serumalbumin, Neopepton, HEPES, Natriumcitrat, Glucose, Natriumpyruvat, N-Acetyl-D-Glucosamin, Natriumbikarbonat und TC Yeastolate bei Raumtemperatur über 3 Stunden in destilliertem Wasser gelöst. Im nächsten Schritt erfolgte die Hitzeinaktivierung des Kaninchenserums bei 56 °C über einen Zeitraum von 45 min. Nach der Zugabe von CMRL Medium 1066 10x, Kaninchenserum und Kanamycin 80 µl/100 ml wurde die Lösung auf pH = 7,4 eingestellt und sowohl durch Filter der Größe 0,65 µm (Watman No5, Bestellnr. 1820047), 0,45 µm und 0,2 µm (Nalgene, Bestellnr. 296-4545 und 2964520) filtriert. Schließlich wurde die Gelatine unter sterilen Bedingungen hinzugefügt, nachdem sie zuvor bei 121 °C und 3 bar für 20 min autoklaviert wurde.

3.7.3 Kulturelle Anzüchtung der Borrelien und Herstellung des Antigenlysats

Bevor die Antigenpräparation durchgeführt werden konnte, mussten die mit Glycerol versetzten Borrelien angezüchtet werden. Zu diesem Zweck wurde ein Aliquot der Borrelien in 6 ml ihres Mediums auf zwei Röhrchen überführt. Danach wurde die Kultur bei 33 °C und 5 % O₂ inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Bakterien täglich kontrolliert und nachdem sie eine Wachstumsdichte von 10⁷ bis 10⁸ Borrelien/ml erreicht haben, nach vier bis sechs Tagen umgesetzt. Dazu wurde die komplette Kultur in einen Liter BSK II-Medium überführt. Dieser Vorgang erfolgte unter sterilen Bedingungen, da die Kultur schnell kontaminiert werden kann. Nach weiteren fünf Tagen wurde das Wachstum der Borrelienkultur täglich adspektorisch kontrolliert. Eine Gelbverfärbung der klaren Lösung sowie eine dichte Flockenbildung waren als Wachstumskriterium ausschlaggebend. Nach sieben bis neun Tagen befanden sich die Borrelien in der stationären Phase, die durch eine deutliche Ausprägung der genannten Kriterien gekennzeichnet war.

Im nächsten Schritt wurde mit der dicht gewachsenen Kultur die Antigenpräparation durchgeführt. Dazu wurde ein Liter Medium auf vier sterile 250-ml Zentrifugenröhrchen (Oak Ridge Zentrifugenröhrchen, Nalgene, Bestellnr. 3115) aufgeteilt und 15 min bei 10.000 × g und 20 °C zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, Hereaus). Die Überstände wurden vollständig abgegossen und in Alkohol aufgefangen, während die gebildeten Pellets jeweils in 40 ml sterilem PBS gelöst wurden. Die vier mit Pellets und 40 ml PBS gefüllten Röhrchen wurden für 15 min bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Nach erneutem Abgießen der Überstände wurden die Pellets aus jeweils zwei Röhrchen in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt und mit 40 ml PBS gelöst. Danach wurden die beiden Pellets und 40 ml PBS enthaltenden Röhrchen dreimal hintereinander für 15 min bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert, wobei die Überstände zwischen den Durchgängen abgegossen und die Pellets mit weiteren 40 ml PBS gelöst wurden. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Pellets aus beiden Zentrifugationsröhrchen in ein Röhrchen (15-ml Blue Caps Greiner, Bestellnr. 188271) zusammengeführt, in 5 ml PBS gelöst und auf Eis gelagert. Der Aufschluss der Borrelien erfolgte mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus UW2070, Berlin) für 10 - 15 s bei 35 Watt. Während dieser Prozedur war das Röhrchen mit den Borrelien und 5 ml sterilem PBS auf Eis gelagert. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis anhand der Dunkelfeldmikroskopie (Axiolab, Zeiss, Jena) keine lebenden Bakterien mehr nachweisbar waren.

Anschließend wurde das entstandene Bakterienlysats weiterverarbeitet indem die Suspension aus toten Bakterien zunächst auf fünf sterile 1,5-ml Eppendorf Gefäße (Safe-Lock, Bestellnr. 0030120.086) aufgeteilt und anschließend für 10 min bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert wurde. Während das entstandene Pellet verworfen wurde, musste der

Überstand wieder in sterile 1,5 ml-Eppendorf Gefäße überführt und bei -80 °C gelagert werden.

3.8 Bestimmung der Proteinkonzentration der gewonnenen Bakteriensuspension

3.8.1 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Tabelle 4: 1,5 M Tris-Cl, pH = 8,8 Stammlösung

Tris Base		181,5 g
Aqua destillata	quantum satis	800,0 ml
pH mit 6 N und 1 N HCl auf pH = 8,8 einstellen		
Aqua destillata	quantum satis	1000,0 ml

Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 5: 0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8 Stammlösung

Tris Base		60,0 g
Aqua destillata	quantum satis	800,0 ml
pH mit 6 N und 1 N HCl auf pH = 6,8 einstellen		
Aqua destillata	quantum satis	1000,0 ml

Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert.

Tabelle 6: 0,5 % Bromphenol-Blau-Stammlösung

Bromphenol Blau		0,5 g
Aqua destillata	quantum satis	100,0 ml

Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt.

Tabelle 7: Probenpuffer (ohne Glycerol) Stammlösung

0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8	25 ml
β-Mercaptoethanol	10 ml
0,5 % Bromphenolblau	5 ml
Aqua destillata	10 ml

Anschließend wurde die Lösung mit einem 0,2 µm Filter steril filtriert und lichtgeschützt aufbewahrt. Der Puffer musste vor Gebrauch 1:1 mit 10 % SDS vermischt werden.

Tabelle 8: 0,1 % SDS Überschichtungspuffer Stammlösung

Natriumdodecyl-Sulfat		0,4 g
Aqua destillata	quantum satis	400,0 ml

Tabelle 9: 10 % Ammonium Persulfat-Arbeitslösung

APS		0,10 g
Aqua destillata		0,95 ml

Tabelle 10: 10 % SDS Arbeitslösung

Natriumdodecyl-Sulfat		0,30 g
Aqua destillata		2,85 ml

Tabelle 11: Überschichtungspuffer

1,5 M Tris-Cl, pH = 8,8		3,00 ml
10 % SDS		120 µl
Aqua destillata		8,84 ml

Tabelle 12: Waschpuffer

0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8		2,50 ml
10 % SDS		100 µl
10 % APS		60 µl
Aqua destillata		7,36 ml

Tabelle 13: Laufpuffer

Glyzin		57,7 g
Tris Base		12,0 g
Aqua destillata		4,0 l
Natriumdodecyl-Sulfat		4,0 g

Tabelle 14: Auflösungsgel, 12 %ig

Aqua destillata	5,00 ml
Acrylamid-Bisacrylamid	6,00 ml
1,5 M Tris-Cl, pH = 8,8	3,73 ml
10 % SDS	0,15 ml
die Lösung wurde zehn min entgast	
10 % APS	20 µl
TEMED	8 µl

Tabelle 15: Sammelgel, 5 %ig

Aqua destillata	3,03 ml
Acrylamid-Bisacrylamid	625 µl
0,5 M Tris-Cl, pH = 6,8	1,25 ml
10 % SDS	50 µl
die Lösung wurde zehn min entgast	
10 % APS	30 µl
TEMED	8 µl

3.8.2 Durchführung der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese diente zur fraktionierten Darstellung der Proteine, die in der hergestellten Antigenpräparation von *Bbss* enthalten sind. Dazu wurden SDS-Polyacrylamidgele in einer Größe von 6 cm x 10 cm hergestellt. Die angesetzten Lösungen wurden zwischen zwei Glasplatten bis zu einer Höhe von 6 cm gegossen. Nach der Überschichtung mit 1 %iger SDS-Lösung folgte eine einstündige Polymerisierungsphase. Danach wurde zunächst der Überschichtungs- und anschließend der Waschpuffer aufgetragen. Im nächsten Schritt folgte das Gießen der Sammelgele. Nachdem in jedes Gel ein Kamm eingesetzt wurde, schloss sich eine weitere einstündige Polymerisierungsphase an. Im nächsten Schritt wurden die Kämmen entfernt und die Vertiefungen zunächst mit Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurden sowohl die Proteinmarker für die Größenbestimmung (Precision Protein Standards, gefärbt, Biorad, Bestellnr. 161-0372 und Biotinylated SDS-PAGE Standard broad range, ungefärbt, Biorad, Bestellnr. 161-0319) als auch die Antigene aufgetragen.

Während der gefärbte Marker mit 13 µg eingesetzt wurde, mussten 2 µg des ungefärbten, biotinylierten Markers nach fünfminütiger Erhitzung auf 95 °C und anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur, gemischt mit 12 µl Ladepuffer aufgetragen werden. Die hergestellten Antigenpräparationen wurden zunächst für zwei min in kochendem Wasser erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden sie in einer Konzentration von 15 µg je Tasche aufgetragen. Schließlich folgte die Auftrennung der Proteinfractionen im Laufpuffer für 45 Minuten bei 200 Volt sowie die Anfärbung der Proteine.

Um die Vergleichbarkeit der hauseigenen Antigenpräparationen mit früheren Präparationen zu gewährleisten, wurde in einem separaten Gel jeweils eine Probe in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen.

3.8.2.1 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau R250

Die Färbelösung für die Proteinfärbung wurde nach dem Standardprotokoll (SAMBROOK et al., 1989) hergestellt. Dazu wurden 0,25 g Coomassie brilliant blue R250, 90,0 ml Methanol-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1:1 und 10,0 ml geeiste Essigsäure vermischt. Die angesetzte Lösung wurde so lange gerührt, bis der Farbstoff in Lösung gehen konnte. Zur Entfernung der Fremdpartikel wurde die Mischung durch einen 0,2 µm Filter (Nalgene) filtriert. Nach Entfernung der Glasplatten wurde das gesamte Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben. Um ein gutes Anfärben der Proteinbanden zu gewährleisten, wurde das mit Coomassie Blau Färbelösung versetzte Gel bei Raumtemperatur über sechs Stunden auf einer rotierenden Platte gehalten. Da der Farbstoff generell in das Gel eindringt und alles einfärbt, musste das Gel wieder größtenteils entfärbt werden. Die Entfärbelösung setzte sich, abgesehen von Coomassie brilliant blue R250, aus den gleichen Inhaltsstoffen wie die Färbelösung zusammen. Beim Entfärbvorgang wurde das Gel über 12 bis 18 Stunden bei Raumtemperatur auf einer rotierenden Platte gehalten. Dabei wurde die Entfärbelösung vier bis sechs Mal gewechselt. Bevor das entstandene Bandenmuster mittels Scanner (Hewlett Packard) bildlich festgehalten wurde, musste das entfärbte Gel kurz in Wasser gewaschen werden.

3.8.2.2 Proteinfärbung mit dem Silver Stain Kit der Firma Invitrogen

Zur Visualisierung der Proteinfractionen der hauseigenen Antigenpräparationen wurde das SilverQuest™ Silver Staining Kit der Fa. Invitrogen verwendet. Die in dem Testverfahren enthaltenen Lösungen färben Proteinbanden in Polyacrylamidgelen an, indem sie die Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber hervorrufen. Zunächst wurde das Gel mit destilliertem Wasser vorsichtig gewaschen. Im Anschluss daran wurde das Gel für 20 min auf einer rotierenden Platte mit 100 ml Fixiermittellösung bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 100 ml 30 %igem Ethanol und der nachfolgenden Inkubation mit 100 ml Sensibilisierungslösung für jeweils 10 min, folgten zwei weitere Waschvorgänge über 10 min, wobei zunächst 100 ml 30 %iges Ethanol und anschließend 100 ml destilliertes Wasser verwendet wurden. Nachfolgend wurde das Gel 15 min mit 100 ml Färbelösung inkubiert und danach für 20 - 60 s mit 100 ml destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel für 4 - 8 Minuten mit 100 ml Entwicklerlösung inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurden 10 ml Stopplösung hinzugegeben und es folgte eine weitere Inkubationsdauer von 10 min. Ein Farbumschlag von pink zu farblos zeigte die Beendigung des Entwicklungsvorgangs an und das Gel wurde gewaschen und eingescannt.

3.9 Indirekte Nachweisverfahren von *BbsI*

3.9.1 Puffer, Lösungen und Reagenzien für das KELA-Verfahren

Tabelle 16: PBS 10-fach konzentriert (PBS 10 ×)

KH ₂ PO ₄		3,54 g
Na ₂ HPO ₄		14,80 g
NaCl		85,00 g
Aqua destillata	quantum satis	1000,00 ml

Da es sich hierbei um eine 10-fach konzentrierte Lösung handelt, wird für die Herstellung der einfachen Arbeitslösung (PBS) ein Teil PBS 10 × mit 9 Teilen destilliertem Wasser gemischt.

PBS-Tween (PBST) entstand aus der Zugabe von 0,05 % Tween 20 zu der einfachen Arbeitslösung PBS.

3.9.2 Puffer, Lösungen und Reagenzien zur Herstellung des KELA

Tabelle 17: 1 M Natriumcarbonat Stammlösung (Na₂CO₃)

Na ₂ CO ₃		53,00 g
Fa. Merck Bestellnr. 106392		
Aqua destillata	quantum satis	500,00 ml

Tabelle 18: 1 M Natriumhydrogencarbonat Stammlösung (NaHCO₃)

NaHCO ₃ Fa. Merck Bestellnr. 106323		42,00 g
Aqua destillata	quantum satis	500,00 ml

Die Natriumcarbonat- und Natriumhydrogencarbonat Stammlösung wurde bei 4 °C gelagert.

Tabelle 19: 0,1 M Carbonatpuffer Arbeitslösung (CO₃)

1 M Na ₂ CO ₃		71,30 ml
1 M NaHCO ₃		28,00 ml
Aqua destillata		800,00 ml
Am pH-Meter mit 1M NaOH und 1M HCl pH = 9,6 einstellen		
Aqua destillata	quantum satis	1000,00 ml

Die Arbeitslösung wurde im Anschluss mit 0,2 µm steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 20: 10 % SDS-Puffer

Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) Fa. Serva Bestellnr. 20765		0,30 g
Aqua destillata		2,85 ml

Dieser Puffer war bei Raumtemperatur 1 Woche haltbar.

Tabelle 21: CO₃/ME/SDS (Antigen auflösende Reagenz)

CO ₃		25 ml
β-Mercaptoethanol Fa. Neolab Bestellnr. 5655		500 µl
10 % SDS		500 µl

Die Lösung wurde in dunkle Flaschen gefüllt, mit einem Gummistopfen verschlossen und zusätzlich mit Parafilm abgedichtet. Die Aufbewahrung erfolgte unter Lichtschutz bei Raumtemperatur.

3.9.3 Puffer, Lösungen und Reagenzien für die Durchführung des KELA

Tabelle 22: PBST mit 2 % Milch

Magermilchpulver Fa. Merck Bestellnr. 115363		2,00 g
PBST	quantum satis	100,00 ml

Als Konjugat für die Hunde-Kontrollseren diente ein HRP-konjugiertes Ziege-anti-Hund-IgG (Cappel Goat-anti-dog-IgG HRP, Firma MP Biomedicals, Bestellnr. 855332). Für die Pferdeseren wurde ein HRP-konjugiertes Ziege-anti-Pferd-IgG (Goat-anti-horse-IgG HRP, Fa. KPL-medac, Katalognr. 14-21-06) eingesetzt. Für den Substratumsatz wurde das TMB Peroxidase Substrat System verwendet (TMB 2-C Microwell Substrate, KPL, Bestellnr. 50-76-00).

3.9.4 KELA

3.9.4.1 Herstellung der KELA-Platten

Damit die Pferdeseren untersucht werden konnten, wurden KELA-Platten (C96 Maxisorb, Nunc, Bestellnr. 430341) nach dem in der Cornell University, Ithaca, New York etablierten Protokoll mit hauseigenem Antigen (*Borrelia*-Lysat-Antigen 20100119) und rekombinanten OspA (rOspA) beschichtet. Für die Beschichtung der KELA-Platten wurde 0,1 M Carbonatpuffer Arbeitslösung (CO₃), CO₃/ME/SDS-Lösung, Lyme-Antigen in einer Konzentration von 0,34 µg pro Kavität und rOspA (*Borrelia Burgdorferi* Bacterial Extract Recombitek® Lyme, Firma Boehringer-Ingelheim, Charge: 42147 Exp 04/02/11) in einer Konzentration von 1 µg pro Kavität gut vermischt und für 10-15 min bei 75 rpm auf den Kippschüttler verbracht. Die Hälfte aller Kavitäten wurde mit 100 µl der Lyme-Antigen-Carbonatmischung befüllt, während in die andere Hälfte der Kavitäten zur Ermittlung der Negativwerte lediglich 100 µl Carbonatpuffer pipettiert wurde.

Ein Teil der Serumproben wurde zusätzlich mittels KELA-Platten untersucht, die ausschließlich mit reinem rekombinanten OspA (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Frankfurt) beschichtet wurden. Hierbei wurde rOspA der Spezies *Bbss ZS7*, *B. garinii ZQ1* oder *B. afzelii PKo* in einer Konzentration von 1 µg in 100 µl CO₃ per well in die Hälfte der vorhandenen Kavitäten pipettiert. Die andere Hälfte der auf einer ELISA-Platte zur Verfügung stehenden Kavitäten wurde zur Ermittlung der Negativwerte lediglich mit 100 µl CO₃ beschichtet.

Die beschichteten KELA-Platten wurden anschließend mit einer Abdeckfolie (Firma Ratiolab Artikelnr. 6018412) gut verschlossen und für 5 min bei 75 rpm auf den Kippeschüttler gegeben. Danach mussten die Platten für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden. Bevor die KELA-Platten verwendet wurden, mussten diese im Anschluss an den Kühlprozess für mindestens 24 Stunden bei -20 °C im Gefrierschrank belassen werden. Um Beschichtungsveränderungen aufgrund der Lagerung zu minimieren, wurden die KELA-Platten spätestens nach acht Wochen aus dem Gefrierschrank genommen und verwendet.

3.9.4.2 Durchführung des KELA

Zunächst wurden die KELA-Platten bei einer Temperatur von 37 °C im Schüttelinkubator (New Brunswick) ohne Rotation vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Platten viermal mittels PBST im ELISA-Washer (Aqua max 2000, MDS) gewaschen. Nach dem vierten Waschdurchgang waren die Platten noch feucht und mussten auf Papiertüchern kräftig ausgeklopft werden. Danach wurde jede Kavität mit 100 µl der im Verhältnis 1:10 mit PBST und 2 % Milch verdünnten Serumproben befüllt. Jede Probe belegte dabei zwei Kavitäten mit und zur Ermittlung der Negativkontrolle zwei Kavitäten ohne Antigenlysat. Danach wurde die mit Serumproben belegte Platte für eine Stunde bei 37 °C im Schüttelinkubator ohne Rotation inkubiert und anschließend erneut viermal mit PBST im ELISA-Washer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde jede Kavität der KELA-Platte mit 100 µl Konjugat befüllt. Dazu wurde für die Hundeseren HRP-konjugiertes Ziege-anti-Hund-IgG und für die Pferdeseren HRP-konjugiertes Ziege-anti-Pferd-IgG im Verhältnis 1:1000 mit PBST und 2 % Milch verdünnt. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur und einem weiteren sich viermal wiederholenden Waschvorgang mit PBST wurde in jede Kavität 100 µl TMB pipettiert. Die Substratlösung wurde kurz vor dem Auftragen angesetzt, indem die Lösung TMB A und TMB B in einem Verhältnis von 1:1 gemischt wurden. Exakt 1 min und 45 s nach Beginn der Substratpipettierung erfolgte die Auswertung der Extinktion im ELISA-Reader (SpectraMAX340PC, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 650 nm. Die Bewertung der Farbentwicklung erfolgte kinetisch, indem die Extinktion dreimal im Abstand von 45 Sekunden erfasst wurde. Auf diese Weise konnte die Zunahme der Farbtintensität über den Zeitverlauf berechnet werden. Damit die resultierenden Werte aussagekräftig und mit den gültigen Einheiten der Cornell University in Ithaca, USA, vergleichbar waren, mussten die Ergebnisse umgerechnet werden. Dazu wurden auf jede KELA-Platte vier Hundeseren aufgetragen: eine Probe aus einem SPF-Hund, der keine Antikörper gegen *Bbs1* aufweist, eine Kontrollprobe aus einem experimentell mit *Bbss* infizierten Hund mit hohem Antikörper-

titer, eine Serumprobe aus einem zweimalig mit der Lysat-Vakzine Lyme Vax® immunisierten Hund mit niedrigem OspA-Antikörpertiter und eine Probe aus einem dreimalig mit Lyme Vax® geimpften Hund mit hohem OspA-Antikörpertiter. Da für die genannten Hundekontrollseren standardisierte Werte vorlagen, konnten Korrelationen berechnet werden. Die nach der Auswertung jeder KELA-Platte im ELISA-Reader erhaltenen Werte der vier Hundeseren wurden hierzu mit den vorhandenen standardisierten Werten der Kontrollseren verglichen und ins Verhältnis gesetzt. Aus dem Verhältnis wurde schließlich eine Gerade berechnet. Das Ergebnis dieser Regression war eine Formel, mit der es uns möglich war, die Werte der zu analysierenden Pferdeseren umzurechnen. Somit waren die Resultate sowohl standardisiert, als auch vergleichbar.

Zur Interpretation der gemessenen Antikörperlevel in den Pferdeseren wurde zusätzlich die hoch positive Serumprobe des experimentell infizierten Pferdes RKS-B-0496-E auf jede KELA-Platte aufgetragen. Die Pferde, deren gemessener Antikörpertiter höher war als der gemessene Wert der Serumprobe RKS-B-0496-E, wurden für seropositiv befunden.

3.9.5 LIA der Firma Sekisui Virotech GmbH

3.9.5.1 Verbrauchsmaterial, Puffer und Lösungen für den LIA

Der Borrelia Veterinär plus OspA LINE ist ein IgG Line Immunoblot zur qualitativen Analyse der in den Hunde- und Pferdeseren vorhandenen IgG-Antikörper gegen *Bbsl*. Dieses serologische Nachweisverfahren wurde von der Firma Sekisui Virotech GmbH in Rüsselsheim, Deutschland, bezogen (Bestellnr. DE226G32 und DE226K62).

Tabelle 23: Packungsinhalt des Borrelia Veterinär plus OspA LINE für 32 Bestimmungen

Nitrozellulose Teststreifen mit aufgesprühten Antigenen	32 Streifen
IgG Cut off Kontrolle, Pferdeserum, vorverdünnt	0,5 ml
Verdünnungs-/Waschpuffer, pH 7,3 (10x konzentriert)	100 ml
Anti-Pferd IgG-Konjugat (100x konzentriert)	0,7 ml
Substrat (BCIP/NBT)	57 ml
Auswertungsprotokollblatt	1 St

Tabelle 24: Herstellung des endverdünnten Verdünnungs-/ Waschpuffer

Verdünnungs-/Waschpuffer, pH 7,3 (10x konzentriert)	100 ml
Aqua destillata	900 ml

Der Waschpuffer wurde vor dem Gebrauch mittels Magnetrührer gut durchgemischt.

Tabelle 25: Herstellung der IgG-Konjugatverdünnung

Anti-Pferd IgG-Konjugat (100x konzentriert)	600 µl
Verdünnungs-/ Waschpuffer endverdünnt	60 ml

Die IgG-Konjugatverdünnung wurde erst kurz vor dem Auftragen angesetzt.

3.9.5.2 Durchführung des LIA

Zunächst wurde jede Rinne der Inkubationswannen (Fa. Sekisui Virotech GmbH Bestellnr. WE 300.08) mit einem Nitrozellulosestreifen und 1,5 ml endverdünntem Waschpuffer versehen. Anschließend wurden pro Testkit 100 µl der IgG Cut off Kontrolle in die erste Vertiefung der Inkubationswanne pipettiert. Die zu untersuchenden Pferdeseren wurden im Verhältnis 1:100 mit dem endverdünnten Waschpuffer verdünnt, indem eine Rinne der Inkubationswanne mit 15 µl des hoch positiven Kontrollserums RKS-B-0496-E und die restlichen Vertiefungen mit jeweils 15 µl der zu untersuchenden Pferdeseren befüllt wurden. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min auf dem Kippschüttler wurden die Teststreifen dreimal für jeweils 5 min mit dem Verdünnungs-/ Waschpuffer gewaschen. Nachdem die Nitrozellulosestreifen vollständig von Waschpuffer befreit waren, wurde zu jedem Teststreifen 1,5 ml der im Verhältnis 1:100 hergestellten IgG-Konjugatverdünnung gegeben. Die Inkubationswannen wurden erneut für 30 min bei Raumtemperatur auf den Kippschüttler verbracht und anschließend dreimal für jeweils 5 min mit dem Waschpuffer gewaschen. Um eindeutige und aussagekräftige Ergebnisse zu erlangen, mussten die Teststreifen vor dem Auftragen von jeweils 1,5 ml Substrat pro Vertiefung für 1 min mit 1,5 ml Aqua destillata gewaschen werden. Die mit Substrat versehenen Nitrozellulosestreifen wurden für exakt 12 min auf dem Kippschüttler inkubiert und danach dreimal kurz mit Aqua destillata gewaschen. Schließlich wurden die Teststreifen vollständig auf Papiertüchern getrocknet und auf das Protokollblatt geklebt.

Zur Auswertung des auf den Nitrozellulosestreifen ersichtlichen Bandenmusters wurden speziesspezifische Beurteilungskriterien aufgestellt. Hierbei wurden nur Banden berücksichtigt, deren Intensität mindestens der Farbinnenstärke der IgG-Cut-Off-Bande entsprach. Anhand der Positionierung der aufgetretenen Banden auf dem Teststreifen war abzulesen, gegen welche Borrelienantigene spezifische Antikörper in den Serumproben vorhanden waren. Bei den auf Nitrozellulose gesprühten Antigenen handelte es sich um

VlsE-Mix-Hund, OspA-Mix, DbpA-Mix, OspC-Mix, BmpA (p39), p58, p83 und VlsE-Mix-Pferd. Das Antigen VlsE-Mix enthält zwei rekombinante Antigene der Genospezies *Bbss* (B31) und *B. garinii* (IP90). OspA-Mix besteht aus drei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. afzelii* (PKo), *B. bavariensis* (PBi) und *B. garinii* (PBr). OspC-Mix enthält drei rekombinante Antigene der Genospezies *B. afzelii* (PKo), *B. bavariensis* (PBi) und *Bbss* (ZS7). Dagegen besteht DbpA-Mix aus zwei rekombinanten Antigenen der Genospezies *B. bavariensis* (PBi) und *B. garinii* (PBr) sowie dem hochaufgereinigten *B. afzelii* (PKo).

Tabelle 26: Bedeutung der Antigene im Borrelia Veterinär plus OspA LINE

Antigen	Diagnostische Bedeutung	Antikörperspezifität
VlsE-Mix	Marker für Erregerkontakt, bzw. Wildinfektion mit <i>Bbsl</i>	Spezifisch
OspA-Mix	OspA-Antikörper sind vor allem nach Impfungen nachweisbar	Hochspezifisch, außer beim Pferd
DbpA-Mix	DbpA-Antikörper finden sich vornehmlich bei fortgeschrittenen LB-Infektionen	Hochspezifisch
OspC-Mix (p23)	OspC-Antikörper finden sich bei Wildinfektionen und teilweise nach Impfungen	Hochspezifisch
BmpA (p39)	Marker für disseminierte LB-Infektionen	Hochspezifisch
p58	p58-Antikörper finden sich vornehmlich bei disseminierten LB-Infektionen	Hochspezifisch
p83	Marker für fortgeschrittene LB-Infektionen	Hochspezifisch

Tabelle 27: Auswertungskriterien des Borrelia Veterinär plus OspA LINE beim Pferd

Bandenmuster	Befund	Interpretation
0 Banden oder Banden < cut off	negativ	kein Hinweis auf Erregerkontakt
VlsE-horse + 0 - 2 Banden	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
VlsE-horse + mindestens 3 Banden	Infektion	Hinweis auf Infektion
VlsE-horse + DbpA + 1 Bande	Infektion	Hinweis auf Infektion
0 - 2 Banden ohne VlsE-horse	negativ	kein Hinweis auf Erregerkontakt
3 Banden ohne VlsE-horse	grenzwertig	Hinweis auf Erregerkontakt
4 Banden ohne VlsE-horse	Infektion	Hinweis auf Infektion

4 Ergebnisse

4.1 Voruntersuchung der Pferdeserumproben

Im Zusammenhang mit der Durchführung einer Allgemeinuntersuchung wurden bei 194 Pferden Blutproben entnommen. Zur Auswahl der studienberechtigten Pferde wurden die Serumproben im Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, veterinärwissenschaftliches Department der LMU München, mit einem hauseigenen Zweistufentest analysiert. Dabei wurden nur Pferde in die Studie aufgenommen, die mittels KELA und LIA negativ oder schwach grenzwertig auf das Vorhandensein von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern getestet wurden.

4.1.1 Untersuchung mit dem KELA-Verfahren

Zunächst wurden alle Serumproben mit dem KELA untersucht. Der KELA diente als Suchtest für *Bbsl*-spezifische Antikörper in den Pferdeseren. Neben den zu untersuchenden Pferdeseren wurde jede KELA-Platte mit der hochpositiven Serumprobe RKS-B-0496-E belegt. Diese Probe diente als Kontrollserum indem die gemessenen Antikörperspiegel in den Pferdeseren mit dem Antikörperspiegel der Probe RKS-B-0496-E verglichen wurde. Somit konnte eine Ersteinschätzung im Hinblick auf eine Infektion mit *Bbsl* erfolgen, die bei positivem Befund mit Hilfe des sich anschließenden Borrelia Veterinär plus OspA LINE® bestätigt werden musste.

Von 194 Proben wiesen 17 Pferdeseren (8,8 %) höhere *Bbsl*-spezifische Antikörperspiegel auf als das Kontrollserum 0496-E. Bei 30 Serumproben (15,4 %) konnten Antikörperspiegel gemessen werden, die im Bereich der Positivkontrolle lagen und somit als grenzwertig eingestuft wurden. Die restlichen 147 Pferde (75,8 %) wurden aufgrund der detektierbaren Antikörperspiegel vorerst als *Bbsl*-negativ eingestuft.

4.1.2 Untersuchung mit dem LIA der Firma Sekisui Virotech GmbH

Der LIA diente innerhalb des Zweistufentests als semiquantitatives Nachweisverfahren von borrelienspezifischen Antikörpern in den Pferdeseren und fungierte als Bestätigungstest für eine Infektion mit *Bbsl*. Die Ergebnisse dieses Testverfahrens waren maßgeblich für die Entscheidung, welche Pferde in die Studie aufgenommen wurden. Bei der Auswertung des Borrelia Veterinär plus OspA LINE waren neben positiven und negativen Befunden auch grenzwertige Fälle zu registrieren. Als Teilnahmebedingung wurde ein negatives oder schwach grenzwertiges Ergebnis im LIA festgesetzt. Von den 194 untersuchten Pferden wurden 119 Pferde (61,3 %) als seronegativ eingestuft. Bei 49

Serumproben (25,3 %) zeigte der LIA ein schwach grenzwertiges Ergebnis und 26 Tiere (13,4 %) wurden im Hinblick auf eine Infektion mit *Bbsl* als positiv befunden. Nach diesem Selektionsverfahren wären 168 Pferde für die Studienteilnahme in Frage gekommen. Nachdem die Pferdebesitzer darüber aufgeklärt wurden, dass die Tiere über einen Zeitraum von 13 Monaten für Impfungen und Blutprobenentnahmen zur Verfügung gestellt werden müssen, haben sich letztendlich die Besitzer von 143 Tieren dazu entschieden, an der Studie teilzunehmen.

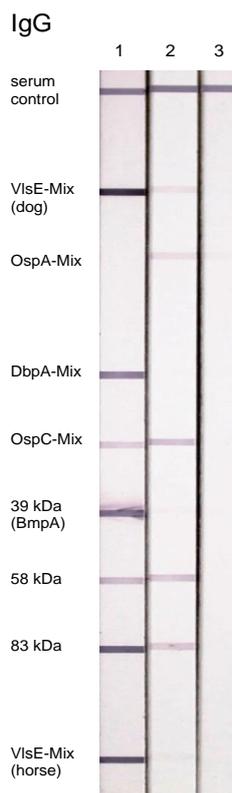


Abbildung 5

Borrelia Veterinär plus OspA LINE zum Zeitpunkt 0

Nr. 1: Serumprobe Pfd-016-A: Dt. Reitpony, Stute, Infektion

Nr. 2: Serumprobe Pfd-017-A: Haflinger, Wallach, grenzwertig

Nr. 3: Serumprobe Pfd-019-B: Shetland Pony, Stute, negativ

Ergebnis	ELISA		LIA	
	Anzahl	Prozent (%)	Anzahl	Prozent (%)
positiv	17	8,8	26	13,4
grenzwertig	30	15,4	49	25,3
negativ	147	75,8	119	61,3

Gesamtzahl	194	100	194	100
-------------------	-----	-----	-----	-----

Tabelle 28:
Vergleich

der Ergebnisse im KELA- und LIA-Verfahren zum Zeitpunkt 0

4.2 Humorale Immunantwort nach Immunisierung

Nachdem alle Pferde in der Gruppe A und B zweimal im Abstand von 14 Tagen mit der Vakzine EquiLyme® immunisiert wurden, fand weitere 14 Tage später die serologische Untersuchung der Pferdeseren zum Tag 28 nach initialer Impfung statt. Die Pferde in der Kontrollgruppe C wurden ebenfalls im Hinblick auf borrelienspezifischen Antikörper analysiert. Zur Ermittlung der Antikörperkinetik nach Immunisierung und der Detektion von Infektionen mit *Bbsl* wurden beginnend mit dem 28. Tag nach der ersten Immunisierung in zweimonatigen Intervallen von allen Pferden Serumproben gewonnen.

4.2.1 Resultate des KELA-Verfahrens und des Borrelia Veterinär plus OspA LINE der Firma Sekisui Virotech GmbH

Um den Antikörperverlauf dokumentieren zu können, wurden die Pferdeseren zunächst bezüglich des Gehaltes an *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörpern analysiert. Zur Bestimmung der Antikörperlevel diente der KELA mit selbst hergestellten Antigenen aus *Bbss* und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme). Zur besseren Übersicht der aus dieser Analyse gewonnenen Ergebnisse sind die Pferde der jeweiligen Gruppe als eine Linie zusammengefasst und als Mittelwert dargestellt. Die in den verschiedenen Gruppen gemessenen Antikörperspiegel wurden mittels t-Test verglichen. Ergebnisse von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet.

Anhand des KELA konnte die Menge der Antikörper über den Zeitverlauf bestimmt und grafisch veranschaulicht werden. Der LIA erlaubt einerseits eine qualitative Erfassung der durch Immunisierung induzierten humoralen Immunantwort, andererseits erlaubt dieses Testverfahren die Unterscheidung von geimpften und infizierten Pferden.

4.2.1.1 Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Impfgruppe A

Die Abbildung 6a zeigt den Antikörperverlauf von allen Pferden aus der Impfgruppe A innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 13 Monaten. Alle Tiere innerhalb der

Gruppe A erhielten innerhalb von 14 Tagen eine zweimalige Antigenverabreichung. Bei 39 Pferden wurde 365 Tage nach der ersten Immunisierung eine Auffrischungsimpfung durchgeführt. Dagegen erhielten vier Pferde 365 Tage nach initialer Immunisierung keine Booster-Impfung. Diese Tiere wurden gesondert dargestellt. Zum Zeitpunkt der ersten serologischen Antikörperdetektion, 28 Tage nach der Erstimmunisierung, war ein Anstieg des Gesamtantikörperlevels um 247 KELA units gegenüber dem Ausgangswert zu verzeichnen. Im weiteren Zeitverlauf fielen die *Bbsl*-spezifische Antikörperspiegel kontinuierlich ab und erreichten 210 Tage nach Erstimmunisierung ein Minimum von 316 KELA units. Somit konnte innerhalb von sieben Monaten nach der Grundimmunisierung ein Rückgang der gegen *Bbsl* gerichteten Antikörperspiegel um 176 KELA units verzeichnet werden. Im weiteren Zeitverlauf bewegten sich die detektierbaren Antikörper auf einem nahezu konstanten Niveau. Im Anschluss an die Booster-Impfung, die 365 Tage nach der Grundimmunisierung durchgeführt wurde, konnte für die Pferde in der Gruppe A ein neuer maximaler Antikörpergehalt in Höhe von 655 KELA units gemessen werden. Verglichen mit dem Antikörperriveau, das 28 Tage nach initialer Immunisierung erreicht wurde, führte die Antigenverabreichung am Tag 365 zu einem hoch signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg des *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörperpeaks in Höhe von 163 KELA units. Bei den Tieren, die zum Tag 365 keine Auffrischungsimpfung erhielten, konnte keine Zunahme des Antikörperriveaus festgestellt werden. Diese Pferde erreichten 390 Tage nach Erstimmunisierung ein minimales Antikörperriveau in Höhe von durchschnittlich 331 KELA units. Der gemessene Wert liegt damit lediglich 86 KELA units über dem Ausgangsniveau am Tag 0 vor der Erstimmunisierung.

Die Abbildung 6b zeigt das Ergebnis des LIA eines Pferdes aus der Gruppe A, das als repräsentativ für alle Pferde aus dieser Impfguppe anzusehen ist. Dieses Tier wurde entsprechend der derzeitigen Impfempfehlung zweimal innerhalb von 14 Tagen mit EquiLyme® immunisiert. Die Auffrischungsimpfung wurde 365 Tage nach der ersten Antigenapplikation durchgeführt. Die Serumprobe 0 wurde zum Zeitpunkt der ersten Antigenverabreichung gewonnen und spiegelt den naiven Zustand des Pferdes wider. Hier sind keinerlei Banden auf dem Nitrozellulosestreifen ersichtlich. Die Probe 1 zeigt die maximale Antikörperantwort des Pferdes auf eine zweimalige Antigenapplikation innerhalb von 14 Tagen. Neben einer für die Impfung typischen Farbentwicklung bei dem 31 kDa schweren Protein OspA sind auch Banden bei einem Molekulargewicht in Höhe von 39 kDa (p39) und 83 kDa (p83) ersichtlich. Beginnend mit dem 90. Tag nach der Erstimmunisierung (Probe 2) ist eine kontinuierliche Abnahme der Bandenintensität bei den Proteinen OspA, p39 und p83 zu beobachten. Während zwischen Tag 150 und 270 (Probe 3 - 5) nach erster Antigenverabreichung noch schwache Signale erkennbar sind, sind 330 Tage nach Erstimmunisierung Banden bei den Proteinen OspA, p39 und p83

nur noch zu erahnen. Die Auffrischungsimpfung am Tag 365 führte dagegen zu einer deutlichen Farbentwicklung bei OspA. Neben deutlich erkennbaren Signalen bei den Proteinen p39 und p83, war zusätzlich eine Bandenfärbung bei dem Protein DbpA zu beobachten. Verglichen mit der Farbintensität nach Grundimmunisierung, führte die Auffrischungsimpfung zu einer Zunahme der Signalintensität bei OspA.

Die Abbildung 6c zeigt das Ergebnis eines Pferdes innerhalb der Gruppe A, das innerhalb von 14 Tagen zweimal immunisiert wurde. Eine Auffrischungsimpfung wurde 365 Tage nach initialer Immunisierung nicht durchgeführt. Die Probe 0 stellt das Resultat der serologischen Untersuchung vor der Immunisierung dar. Nach zweimaliger Vakzination innerhalb von 14 Tagen wurden auf dem Nitrozellulosestreifen Banden bei OspA, OspC und p83 beobachtet (Probe 1). Im weiteren Zeitverlauf nahm die Signalstärke bei allen Proteinen ab (Probe 2 - 4). Bei den Proben 5 und 6 (270 und 330 Tage nach Erstimmunisierung) waren die Signale bei den Proteinen OspC und p83 bereits vollständig erloschen, während die Bande bei OspA nur noch sehr schwach wahrnehmbar war. Da das Pferd 365 Tage nach der ersten Antigenverabreichung keine Boosterimpfung erhielt, war 390 Tage nach initialer Immunisierung keine Bande mehr ersichtlich und es zeigt sich das Bild des naiven Status vor jeglicher Immunisierung (Probe 7).

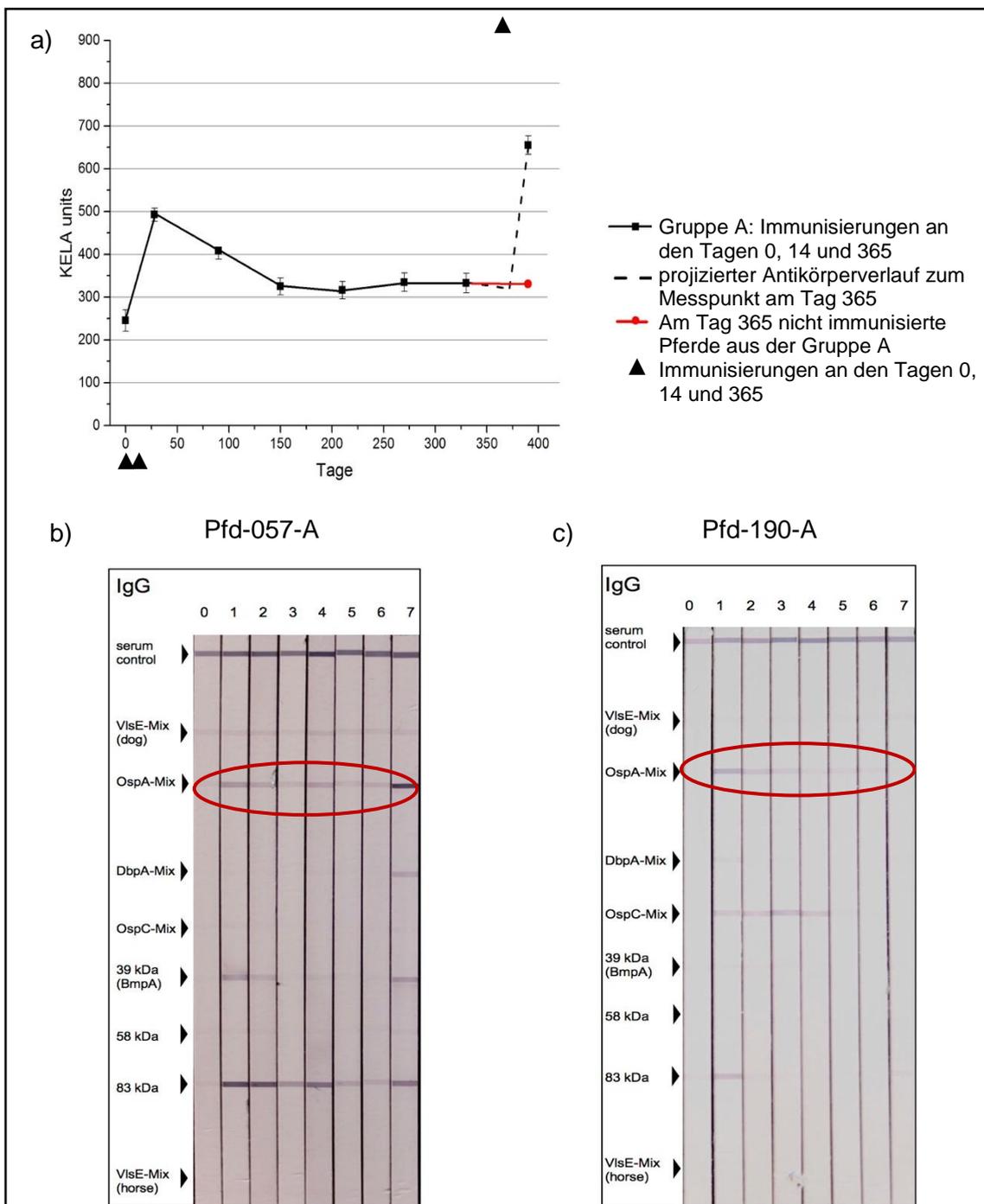


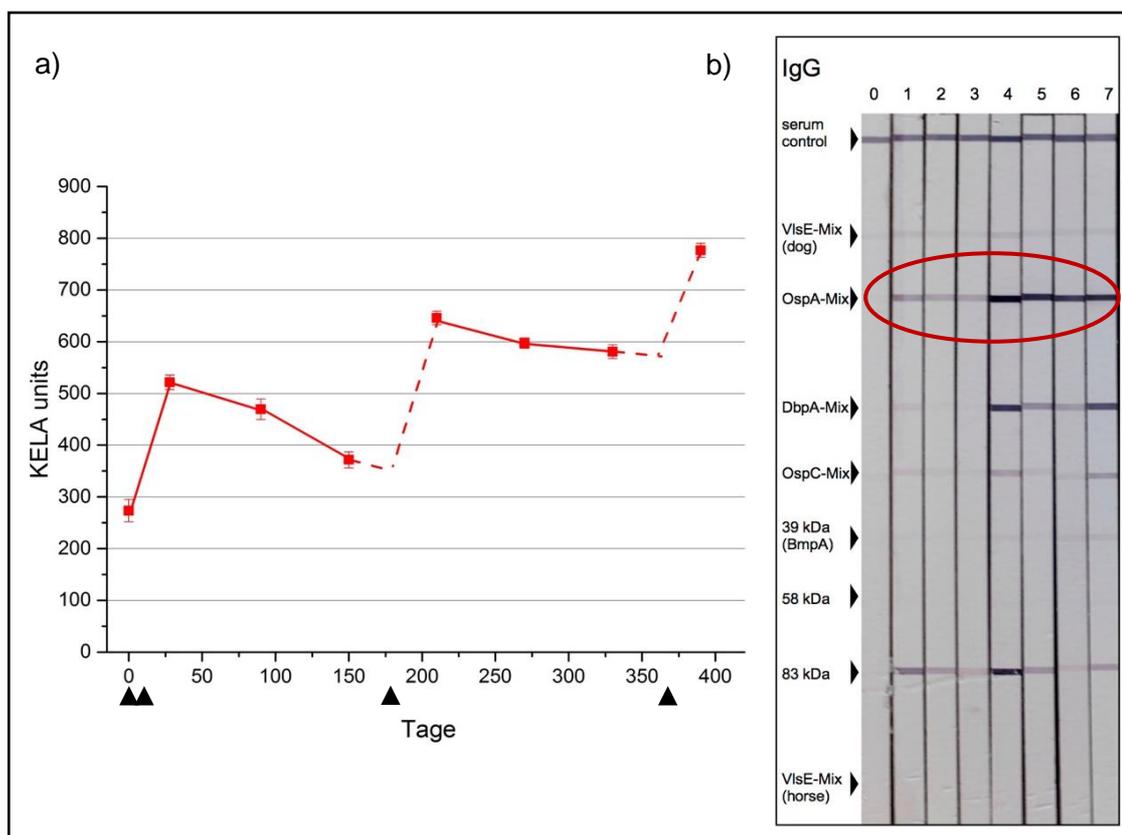
Abbildung 6

- a) Darstellung des *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörperverlaufs nach Impfung der Gruppe A, nachgewiesen durch *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler
- b, c) Die Antikörperproduktion von zwei mit EquiLyme® grundimmunisierten Pferden aus der Gruppe A dargestellt mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Immunisierung
- 1-6: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen
- 7: 28 Tage nach Auffrischungsimpfung von „Pfd-057-A“ am Tag 365
390 Tage nach Erstimmunisierung von „Pfd-190-A“

Die Abbildung 7a zeigt die Antikörperkinetik der Gruppe B nach Impfung mit dem Impfstoff EquiLyme® an den Tagen 0, 14, 180 und 365 +/- 3. Die Tiere der Gruppe B wiesen vor der Immunisierung einen durchschnittlichen Antikörperspiegel von 274 KELA units auf. Vierzehn Tage nach zweimaliger Impfung innerhalb von 14 Tagen war ein Anstieg des *Bbsl*-spezifischen Antikörperspiegels um durchschnittlich 248 KELA units zu verzeichnen. Innerhalb von vier Monaten nach Grundimmunisierung reduzierte sich der Antikörpergehalt auf ein minimales Niveau in Höhe von 372 KELA units. Die Auffrischungsimpfung der Gruppe B, die 180 Tage nach der ersten Antigenapplikation erfolgte, führte zu einem neuen Antikörperpeak in Höhe von 646 KELA units. Verglichen mit dem Antikörperriveau nach Grundimmunisierung führt die zusätzliche Immunisierung, sechs Monate nach initialer Immunisierung, zu einer hoch signifikanten ($p < 0,01$) Zunahme des *Bbsl*-spezifischen Antikörperpeaks um 124 KELA units. Ein Minimum an borrelienspezifischen Antikörpern in Höhe von 580 KELA units konnte 150 Tage nach der Boosterimpfung gemessen werden. Über einen Zeitraum von vier Monaten entspricht dies einer Abnahme um 65 KELA units. Verglichen mit den ersten vier Monaten nach Grundimmunisierung konnten nach der Boosterimpfung höhere und langsamer absinkende Antikörperspiegel detektiert werden. Die vierte Immunisierung innerhalb von 12 Monaten resultierte in einem absoluten Maximalgehalt an borrelienspezifischen Antikörpern in Höhe von 777 KELA units. Die Boosterimpfung am Tag 365 führt somit zu einem hoch signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg des nach Grundimmunisierung erreichten Antikörperpeaks um durchschnittlich 255 KELA Units und des nach dritter Antigenapplikation gemessenen Antikörperspiegels um durchschnittlich 131 KELA units.

In der Abbildung 7b sind die Resultate des LIA bei Beprobung der Seren eines Pferdes aus der Gruppe B dargestellt. Bei der Probe 0 sind keine Farbentwicklungen zu erkennen. Nach zweimaliger Immunisierung innerhalb von zwei Wochen zeigt die Untersuchung der Probe 1 ein Bandenspektrum bei OspA, OspC und dem 83 kDa schweren

Protein p83. Anhand der Proben 2 und 3 ist im zeitlichen Verlauf eine abnehmende Intensität dieser Banden zu beobachten. 180 Tage nach erster Antigenverabreichung wurde eine zusätzliche Booster-Immunsierung durchgeführt, die verglichen mit dem Bandenspektrum nach der Grundimmunsierung zu einer Zunahme der Signalintensitäten bei OspA, OspC und p83 führt. Zusätzlich konnte eine starke Farbentwicklung bei dem Antigen DbpA beobachtet werden. Während die Signalstärke bei DbpA, OspC und p83 bei den Proben 5 und 6 stark abnahm, war die Farbintensität bei OspA verglichen mit dem Zeitrahmen nach zweimaliger Immunsierung deutlich stärker ausgeprägt. Somit führt eine dritte Immunsierung innerhalb von sechs Monaten nach Erstimmunsierung zu einem langsameren Absinken der OspA-spezifischen Antikörper. Die Auffrischungsimpfung 365 Tage nach erster Antigenapplikation führte zu einer erneuten Steigerung der Signalintensität bei den Proteinen OspA, DbpA, OspC und p83. Eine Zunahme des Bandenspektrums war jedoch nicht erkennbar.



4.2.1.3 Ergebnisse der serologischen Untersuchung der Kontrollgruppe C

Die Abbildung 8a zeigt den Verlauf der im zweimonatigen Abstand gemessenen Antikörperkonzentration der nicht immunisierten Kontrollgruppe C. In der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums blieb das Antikörperniveau nahezu konstant. In der zweiten Hälfte war zwischen Tag 150 und 270 kein signifikanter ($p > 0,05$) Anstieg des Antikörperspiegels zu verzeichnen. Jahreszeitlich entspricht dies den Monaten Mai bis September, in denen mit einer hohen Zeckenexposition gerechnet werden kann. Im weiteren Zeitverlauf sanken die *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörperspiegel und erreichten zum Zeitpunkt der letzten serologischen Untersuchung mit 208 KELA units nahezu das Ausgangsniveau zum Zeitpunkt 0.

Die serologische Antikörperdetektion eines Pferdes aus der Kontrollgruppe C mit Hilfe des LIA ist in der Abbildung 8b dargestellt. Die Pferde innerhalb dieser Gruppe wurden nicht immunisiert. Die Untersuchung ergab keine Anhaltspunkte für

Abbildung 7

- a) Darstellung des Antikörperverlaufs nach Impfung der Gruppe B an den Tagen 0, 14, 180 und 365, nachgewiesen durch *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler. Gestrichelte Linien symbolisieren den projizierten Antikörperverlauf zu den Messpunkten am Tag 180 und 365
- b) Die Antikörperproduktion eines dreimalig innerhalb von sechs Monaten immunisierten Pferdes aus der Gruppe B dargestellt mit dem *Borrelia Veterinär plus OspA LINE*
- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
 - 1: 14 Tage nach der zweiten Impfung
 - 2-3: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen
 - 4: 28 Tage nach der dritten Immunisierung
 - 5-6: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen
 - 7: letzte Blutprobenentnahme, 28 Tage nach Auffrischungsimpfung

einen Kontakt mit *Bbsl*. Im weiteren Zeitverlauf kam es zu keinen Bandenerscheinungen, die den Cut-off-Wert überschritten haben.

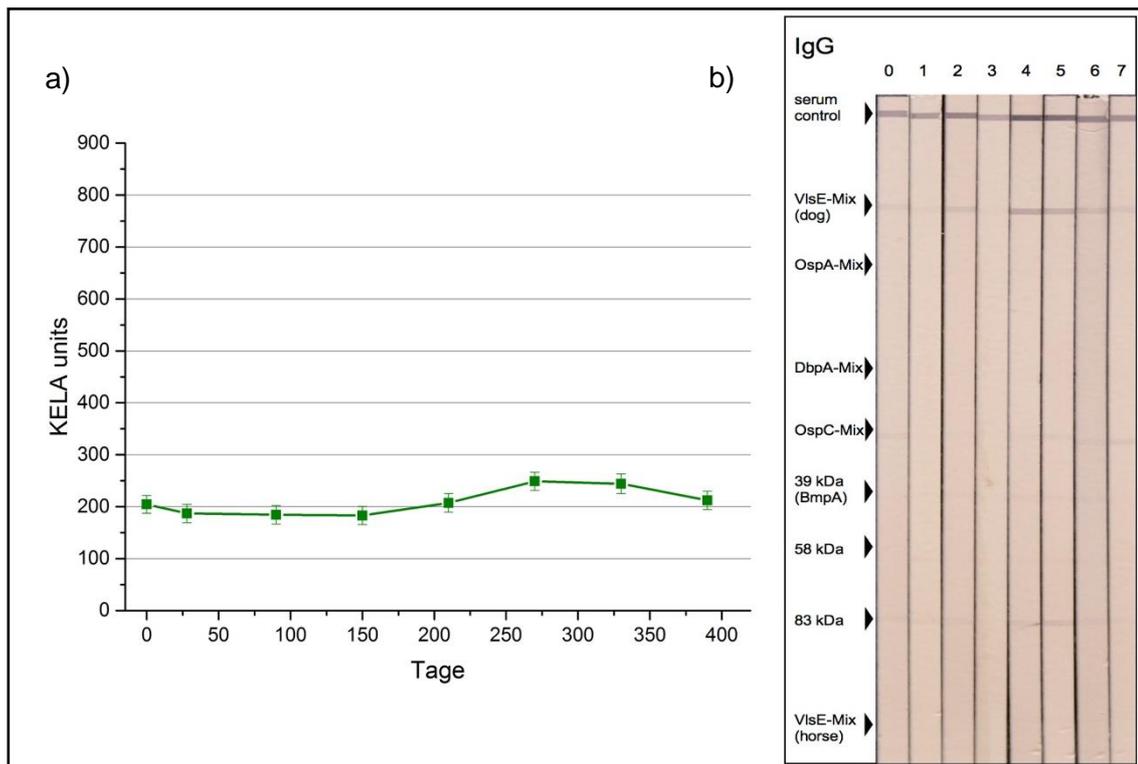


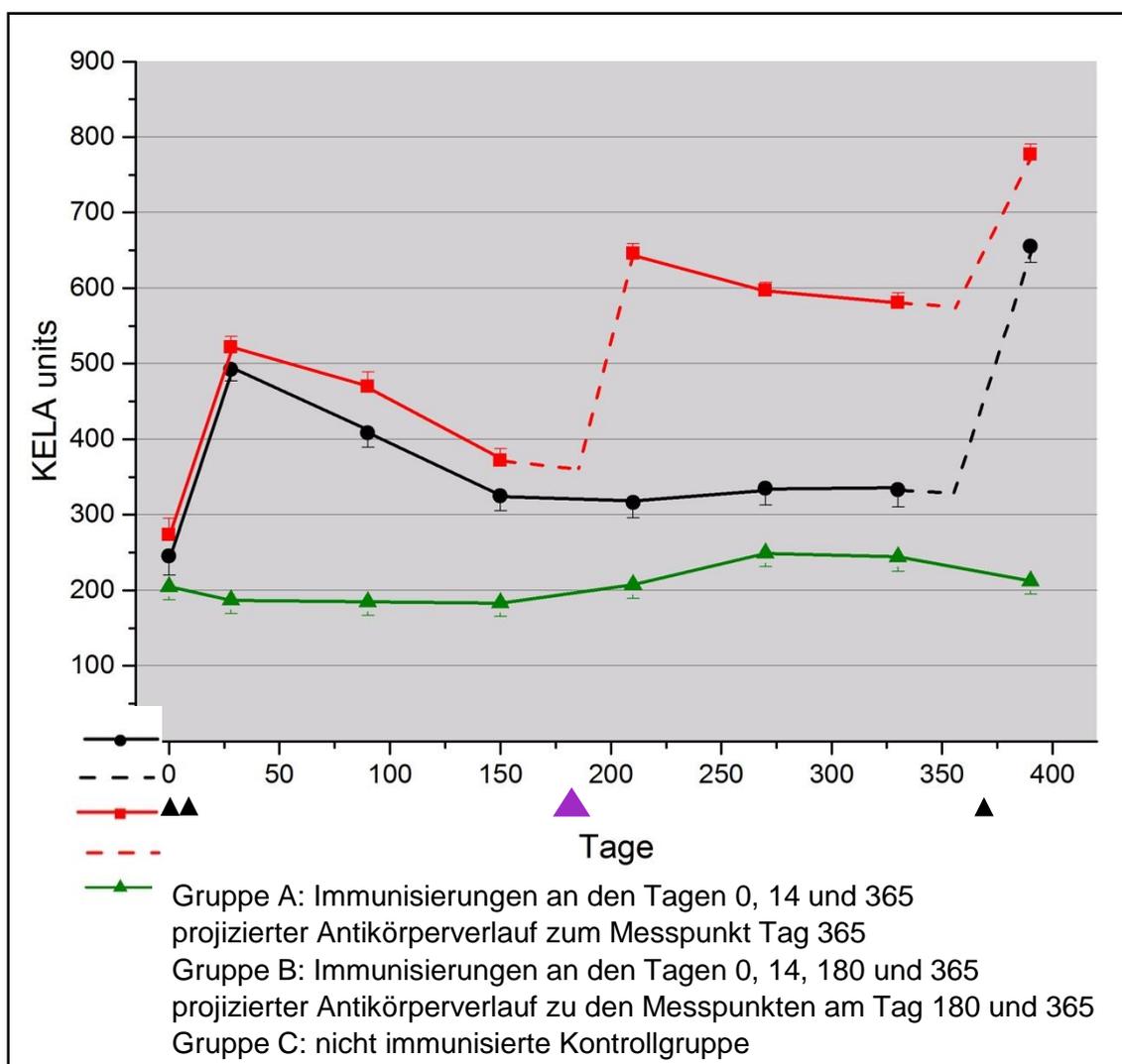
Abbildung 8

- a) Darstellung des Antikörperverlaufs der Kontrollgruppe C, nachgewiesen durch *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler
- b) Die Antikörperproduktion eines nicht immunisierten Pferdes aus der Gruppe C dargestellt mit dem *Borrelia Veterinär plus OspA LINE*

0-7: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen

perverlauf grafisch dargestellt, indem die innerhalb eines Jahres dreimalig immunisierte Impfgruppe A der Gruppe B, die vier Antigenapplikationen erhielt, gegenübergestellt wurde. Zudem wurden zur Veranschaulichung des Impferfolges die Mittelwerte der Gruppe C grafisch aufgetragen. Im ersten Drittel des Untersuchungszeitraums ist anhand der gemessenen Werte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen der Gruppe A und der Gruppe B festzustellen. In beiden Impfgruppen zeigten die Pferde innerhalb von 16 Wochen nach der Grundimmunisierung rasch absinkende Antikörperspiegel. Während für die Tiere innerhalb der Gruppe A 210 Tage nach initialer Immunisierung ein Antikörperspiegel von durchschnittlich 316 KELA units gemessen werden konnte, belief sich das Antikörpersniveau der Gruppe B zu diesem Zeitpunkt auf einen Wert von 646 KELA units. Damit führte die zusätzliche Immunisierung der Gruppe B, die 180 Tage nach initialer Impfung erfolgte, verglichen mit der Gruppe A zu einem doppelt so hohen Antikörpersniveau. Verglichen mit dem Zeitraum nach der Grundimmunisierung, konnte in Folge der zusätzlichen Impfung der Gruppe B ein langsames Absinken der Antikörperspiegel verzeichnet werden. Vor Durchführung der letzten Immunisierung lag

der Gesamtgehalt an *Bbsl*-spezifischen Antikörpern in der Gruppe A bei durchschnittlich 333 KELA units, während für die Gruppe B im Durchschnitt ein Antikörperviveau in Höhe von 581 KELA units gemessen wurde. Letztendlich führte die Auffrischungsimpfung, die 365 Tage nach Erstimmunisierung durchgeführt wurde, in der Gruppe A zu einem um 163 KELA units höheren Antikörperpeak als die Grundimmunisierung. Die vierte Antigenapplikation der Gruppe B innerhalb eines Jahres erzielte einen maximalen durchschnittlichen Antikörperspiegel, der knapp 255 KELA units über dem Maximalwert nach Grundimmunisierung und 131 KELA units über dem Antikörperpeak nach zusätzlicher Antigenverabreichung liegt. Am Ende des Untersuchungszeitraumes, 390 Tage nach initialer Immunisierung, konnte anhand der gemessenen Antikörperspiegel ein hoch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen den Gruppen A und B festgestellt werden. So erreichten die Pferde in der Gruppe B nach vier Immunisierungen einen um durchschnittlich 121 KELA units höheren *Bbsl*-spezifischen Antikörperspiegel als die Tiere in der Gruppe A, die dreimal immunisiert wurden.



- ▲ Immunisierungen der Gruppen A und B an den Tagen 0, 14 und 365
- ▲ zusätzliche Immunisierung der Gruppe B am Tag 180

Abbildung 9

Vergleichende Darstellung des Antikörperverlaufs der Gruppe A und B nach Immunisierung, nachgewiesen durch *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und Standardfehler

4.3 Detektion von durch Impfung induzierten OspA-Antikörpern mithilfe rekombinanten OspA

4.3.1 KELA-Ergebnisse nach Verwendung von rOspA Antigenen aus *Bbss*, *B. garinii* oder *B. afzelii*

Da der Impfstoff EquiLyme® neben der Genospezies *Bbss* auch inaktivierte Antigene der Spezies *B. garinii* und *B. afzelii* enthält, war es von Bedeutung, die durch die Immunisierung hervorgerufene speziesspezifische Antikörperinduktion zu quantifizieren. Dazu wurden KELA-Platten zunächst ausschließlich mit rOspA aus *Bbss* ZS7 beschichtet und der Gehalt an *Bbss*-spezifischen OspA-Antikörpern im Pferd nach Impfung ermittelt. Anschließend wurde sowohl die durch Immunisierung induzierte *B. garinii*-spezifische- als auch die *B. afzelii*-spezifische OspA-Antikörperantwort mittels KELA untersucht. Dazu wurden KELA-Platten entweder mit rOspA aus *B. garinii* ZQ1 oder mit rOspA aus *B. afzelii* PKo beschichtet. In der Abbildung 10 ist die speziesspezifische OspA-Antikörperkinetik nach Immunisierung der Impfgruppen A und B vergleichend mit der Antikörperantwort der nicht-immunisierten Kontrollgruppe C dargestellt. Um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, wurden jeweils acht Pferde aus den Impfgruppen A und B sowie acht Pferde aus der Kontrollgruppe C mit rOspA beschichteten KELA-Platten untersucht.

Insgesamt wurden die Serumproben von 24 Pferden auf das Vorhandensein von OspA-spezifischen Antikörpern analysiert. Bei der grafischen Darstellung der Ergebnisse wurde der Standardfehler aufgeführt.

Wie aus der Abbildung 10a ersichtlich ist, konnte in den Impfgruppen A und B nach zweimaliger Immunisierung innerhalb von 14 Tagen ein OspA-spezifischer Antikörpergehalt gegen *Bbss* zwischen 300 und 400 KELA units gemessen werden. In den folgenden vier Monaten war eine rasche Abnahme der impfspezifischen Immunantwort zu verzeichnen. Während in der Gruppe A bereits 190 Tage nach der ersten Antigenverabreichung keine *Bbss*-spezifischen OspA-Antikörper mehr nachgewiesen wurden, führte die zusätzliche Antigenapplikation der Gruppe B, die 180 Tage nach initialer Immunisierung erfolgte, zu einem maximalen OspA-Antikörperspiegel in Höhe von 456 KELA units. Innerhalb von vier Monaten nach der dritten Antigenapplikation sanken die nachweisbaren OspA-Antikörper innerhalb der Gruppe B um durchschnittlich 117 KELA units ab und erreichten damit das Antikörpurniveau nach zweimaliger Immunisierung. Infolge der letzten Auffrischungsimpfung, die 365 +/- 3 Tage nach Erstimmunisierung durchgeführt wurde, konnte in der Gruppe B ein maximales OspA-Antikörpurniveau von über 517 KELA units verzeichnet werden. Dieser gemessene Wert liegt damit signifikant ($p < 0,05$) über dem von der Gruppe A nach Booster-Impfung erreichten OspA-Antikörperspiegel in Höhe von durchschnittlich 420 KELA units. Verglichen mit dem OspA-Antikörperspiegel nach Grundimmunisierung führte die vierte Immunisierung innerhalb von einem Jahr zu einer signifikanten Steigerung ($p < 0,05$) der gegen *Bbss* gerichteten OspA-Antikörpermenge um 152 KELA units. Mit einem Antikörperzuwachs von 121 KELA units konnte die Gruppe A, verglichen mit dem OspA-Antikörpurniveau nach zweimaliger Immunisierung, ebenfalls einen signifikanten ($p < 0,05$) Antikörperanstieg verzeichnen. In der Kontrollgruppe C hingegen konnte während des gesamten Untersuchungszeitraums keine *Bbss*-spezifische OspA-Antikörperantwort beobachtet werden. In der Abbildung 10b ist die nach Impfung mit EquiLyme® detektierbare OspA-Antikörperantwort gegen *B. garinii* dargestellt. In den Impfgruppen A und B konnten nach zweimaliger Immunisierung innerhalb von 14 Tagen *B.-garii*-spezifische OspA-Antikörperspiegel in Höhe von durchschnittlich 200 KELA units detektiert werden. Verglichen mit dem *Bbss*-spezifischen OspA-Antikörpergehalt nach der Grundimmunisierung, waren die gemessenen Werte bei der Verwendung von rOspA aus *B. garinii* signifikant ($p < 0,05$) niedriger. Aufgrund des geringeren OspA-Antikörpergehaltes und einer raschen Abnahme der OspA-spezifischen Antikörper gegen *B. garinii*, konnten in beiden Impfgruppen bereits 150 Tage nach der Erstimmunisierung keine OspA-Antikörper mehr nachgewiesen werden. Die sechs Monate nach der ersten Antigenverabreichung durch-

geführte Immunisierung der Gruppe B führte zu einem Anstieg der gegen *B. garinii* gerichteten Impfantikörper um 260 KELA units und resultierte in einer Steigerung des nach zweimaliger Immunisierung erreichten Antikörperpeaks um durchschnittlich 148 KELA units. Anschließend konnte innerhalb der Gruppe B ein langsames Absinken des OspA-spezifischen Antikörperspiegels beobachtet werden. Zum Zeitpunkt des niedrigsten Antikörpervniveaus wurde 330 Tage nach der Grundimmunisierung bei den Pferden in der Gruppe A ein OspA-Antikörperspiegel in Höhe von durchschnittlich 68 KELA units gemessen, während die Gruppe B *B.-garii*-spezifische OspA-Antikörper in Höhe von 194 KELA units aufwies. Die 365 +/- 3 Tage nach erster Antigenapplikation durchgeführte Auffrischungsimpfung führte dagegen bei beiden Impfgruppen zu einem Anstieg der gegen *B. garinii* gerichteten OspA-Antikörper auf ein Niveau von über 400 KELA units. Verglichen mit dem Zeitpunkt nach zweimaliger Immunisierung, führte die vierte Antigenapplikation innerhalb der Gruppe B zu einem hoch signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg des Antikörperpeaks um 102 KELA units. Bei der Gruppe A hingegen führte die Auffrischungsimpfung verglichen mit der Grundimmunisierung zu einer hoch signifikanten ($p < 0,01$) Steigerung des maximalen Antikörpergehaltes um 219 KELA units. Anhand der von beiden Impfgruppen zum Tag 390 erreichten Antikörperpeaks ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 13 Monaten konnte bei Beprobung der Pferdeseren aus der Kontrollgruppe C keine OspA-spezifische Antikörperantwort gegen *B. garinii* detektiert werden.

Die Abbildung 10c zeigt die gegen *B. afzelii* gerichteten OspA-Antikörperverläufe in den verschiedenen Gruppen. Die zweimalige Immunisierung der Pferde in den Impfgruppen A und B führte zu einem durchschnittlichen OspA-Antikörpervniveau in Höhe von 300 KELA units. Obwohl die folgenden serologischen Untersuchungen bei beiden Impfgruppen einen starken Abfall des Antikörpervniveaus erkennen ließen, sind im Gegensatz zu den *B.-garii*-spezifischen OspA-Antikörpern auch 150 Tage nach erster Antigenverabreichung noch geringe *B.-afzelii*-spezifische OspA-Antikörpertiter nachweisbar. Die Immunisierung der Pferde in der Gruppe B, die sechs Monate nach Erstimmunisierung durchgeführt wurde, führte zu einem ausgeprägten Anstieg der OspA-spezifischen Antikörper um durchschnittlich 320 KELA units. Der zu diesem Zeitpunkt von der Gruppe B erreichte Antikörperpeak in Höhe von durchschnittlich 438 KELA units entspricht dem gemessenen Wert bei Verwendung von rOspA aus *Bbss* und liegt damit 122 KELA units über dem Antikörpervniveau nach Grundimmunisierung. Hingegen konnten bei den Tieren in der Gruppe A ab dem 190. Tag nach der Erstimmunisierung keine OspA-spezifischen Antikörper mehr detektiert werden. Innerhalb der Gruppe B konnte 330 Tage nach initialer Immunisierung ein Wert in Höhe von 280 KELA units gemessen werden. Dieses

Antikörperrniveau liegt 36 KELA units unter dem Antikörperpeak nach Grundimmunisierung, was auf ein langsames Absinken der OspA-Antikörper nach dritter Antigenapplikation hindeutet. Die Auffrischungsimpfung, die 365 Tage nach der ersten Antigenverabreichung durchgeführt wurde, induzierte bei der Impfgruppe A einen maximalen Antikörperpeak in Höhe von 478 KELA units. Dies entspricht einer signifikanten Steigerung ($p < 0,05$) des nach Grundimmunisierung erreichten Antikörperrniveaus um 186 KELA units. Verglichen mit dem nach Grundimmunisierung gemessenen OspA-Antikörpergehalt, resultierte die vierte Antigenapplikation der Gruppe B binnen einem Jahr in einer hoch signifikanten Zunahme ($p < 0,01$) des OspA-Antikörperpeaks um knapp 190 KELA units auf einen Wert in Höhe von 506 KELA units. Wie es bereits nach Analyse der *B.-garii*-spezifischen OspA-Antikörperantwort zu beobachten war, ist anhand der von den Impfgruppen A und B zum Tag 390 erreichten *B.-afzelii*-spezifischen OspA-Antikörperpeaks kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu verzeichnen. Innerhalb des Beobachtungszeitraums von 13 Monaten konnte bei Beprobung der Pferdeseren aus der Kontrollgruppe C keine OspA-spezifische Antikörperantwort gegen *B. afzelii* detektiert werden.

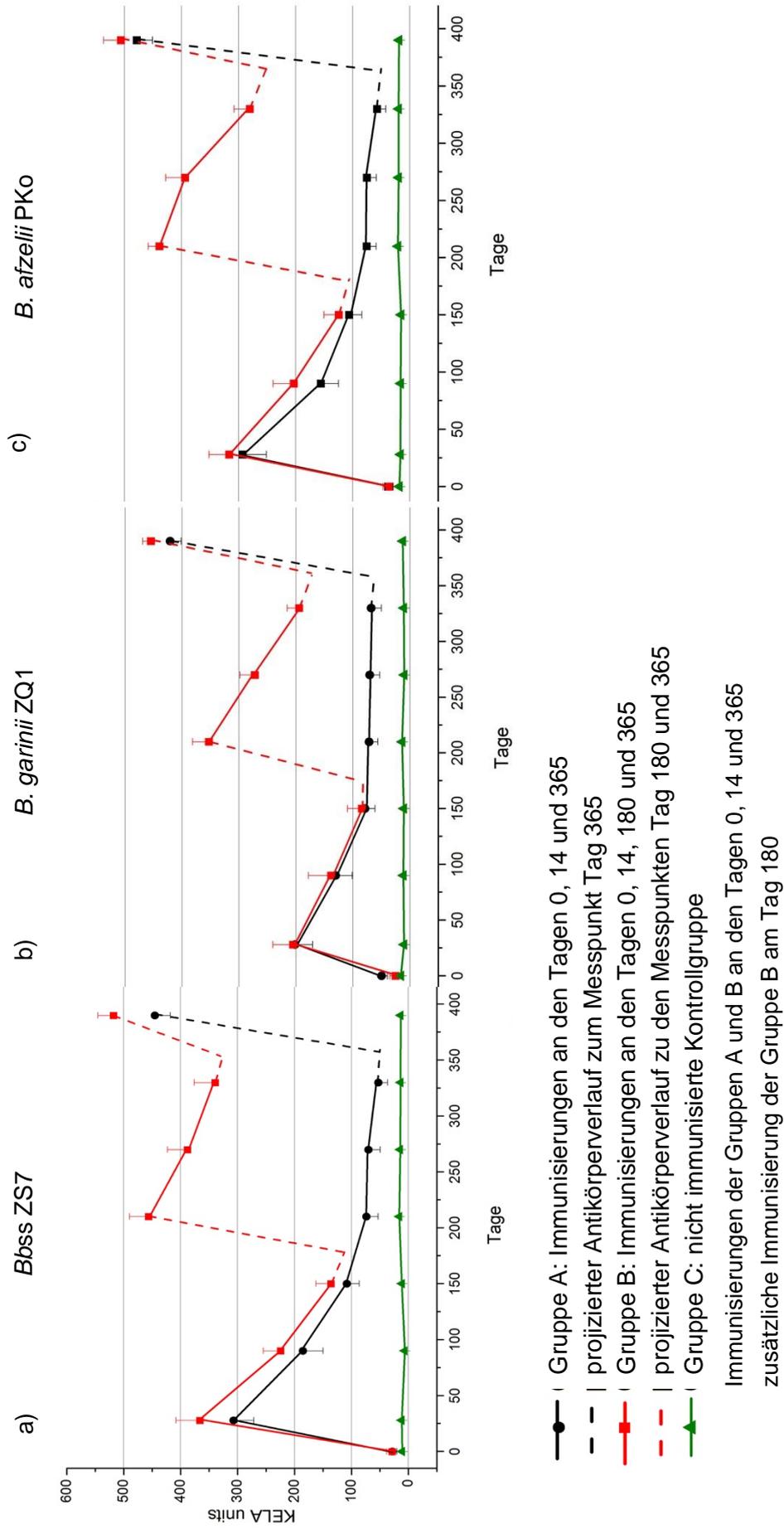


Abbildung 10a-c

Vergleichende Darstellung der OspA-Antikörperverläufe in den verschiedenen Gruppen, nachgewiesen mit rOspA aus *Bbss ZS7*, *B. garinii ZQ1* oder *B. afzelii PKo*

4.3.2 Atypische KELA-Ergebnisse nach Verwendung von rOspA Antigen

Zwei Pferde innerhalb der Impfgruppe A zeigten im KELA nach Verwendung von rOspA-Antigenen der Spezies *Bbss* ZS7, *B. garinii* ZQ1 und *B. afzelii* PKo eine vom Rest der Impfgruppe A abweichende Antikörperkinetik. Wie in der Abbildung 11 erkennbar ist, stiegen die OspA-spezifischen Antikörper nach zweimaliger Antigenapplikation sowohl bei "Pfd-169-A" als auch bei "Pfd-067-A" deutlich an. Innerhalb von 75 Tagen nach der Erstimmunisierung war bei Analyse der OspA-spezifischen Antikörper gegen *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii* ein starker Abfall des Antikörperrniveaus zu beobachten. Entgegen der Erwartungen kam es zwischen 90 und 210 Tagen nach Grundimmunisierung ohne weitere Antigenapplikation bei beiden Pferden zu einem ausgeprägten Anstieg der *Bbss*-spezifischen OspA-Antikörper (Abb. 11a). Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei Detektion der gegen *B. afzelii* gerichteten Antikörper, wobei hier erst ab dem 150. Tag nach Erstimmunisierung eine Zunahme des Antikörperrniveaus wahrzunehmen war (Abb. 11c). Im weiteren Zeitverlauf sanken die *Bbss*- und *B.-afzelii*-spezifischen OspA-Antikörperspiegel wieder ab und erreichten 270 Tage nach initialer Immunisierung ein niedrigeres Niveau. Beim Nachweis der *B.-garii*-spezifischen OspA-Antikörper war bei der Serumprobe "Pfd-169-A" zwischen 90 und 210 Tagen nach erster Antigenverabreichung nur eine leichte Steigerung des OspA-Antikörperspiegels festzustellen, wohingegen das Pferd "Pfd-067-A" in diesem Zeitraum ein relativ konstantes OspA-Antikörperrniveau aufwies (Abb. 11b). Die Auffrischungsimpfung, die 365 Tage nach Erstimmunisierung vollzogen wurde, führte bei beiden Tieren sowohl gegen die Spezies *Bbss* als auch gegen *B. garinii* und *B. afzelii* zu maximalen OspA-Antikörperpeaks.

Die Serumproben "Pfd-169-A" und "Pfd-067-A" wurden im Hinblick auf die Antikörperqualität zusätzlich mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE untersucht. Das Ergebnis ist in der Abbildung 12 dargestellt. Bei Analyse der Serumprobe "Pfd-169-A" war im Vergleich zum Zeitpunkt 2, welcher der serologischen Untersuchung 90 Tage nach initialer Immunisierung gleichzusetzen ist, zum Zeitpunkt 3, 150 Tage nach Erstimmunisierung, eine Steigerung der Bandenintensität bei dem 31 kDa schweren Protein OspA zu beobachten. Bei der Untersuchung des Pferdes "Pfd-067-A" mit dem LIA zeigte sich dagegen zum Zeitpunkt 4, 210 Tage nach erster Antigenverabreichung, eine Zunahme der Signalstärke bei dem Protein OspA. Während des gesamten Untersuchungszeitraums lieferte die serologische Untersuchung der Proben "Pfd-169-A" und "Pfd-067-A" mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE jedoch keine Hinweise auf eine Infektion mit *Bbsl*.

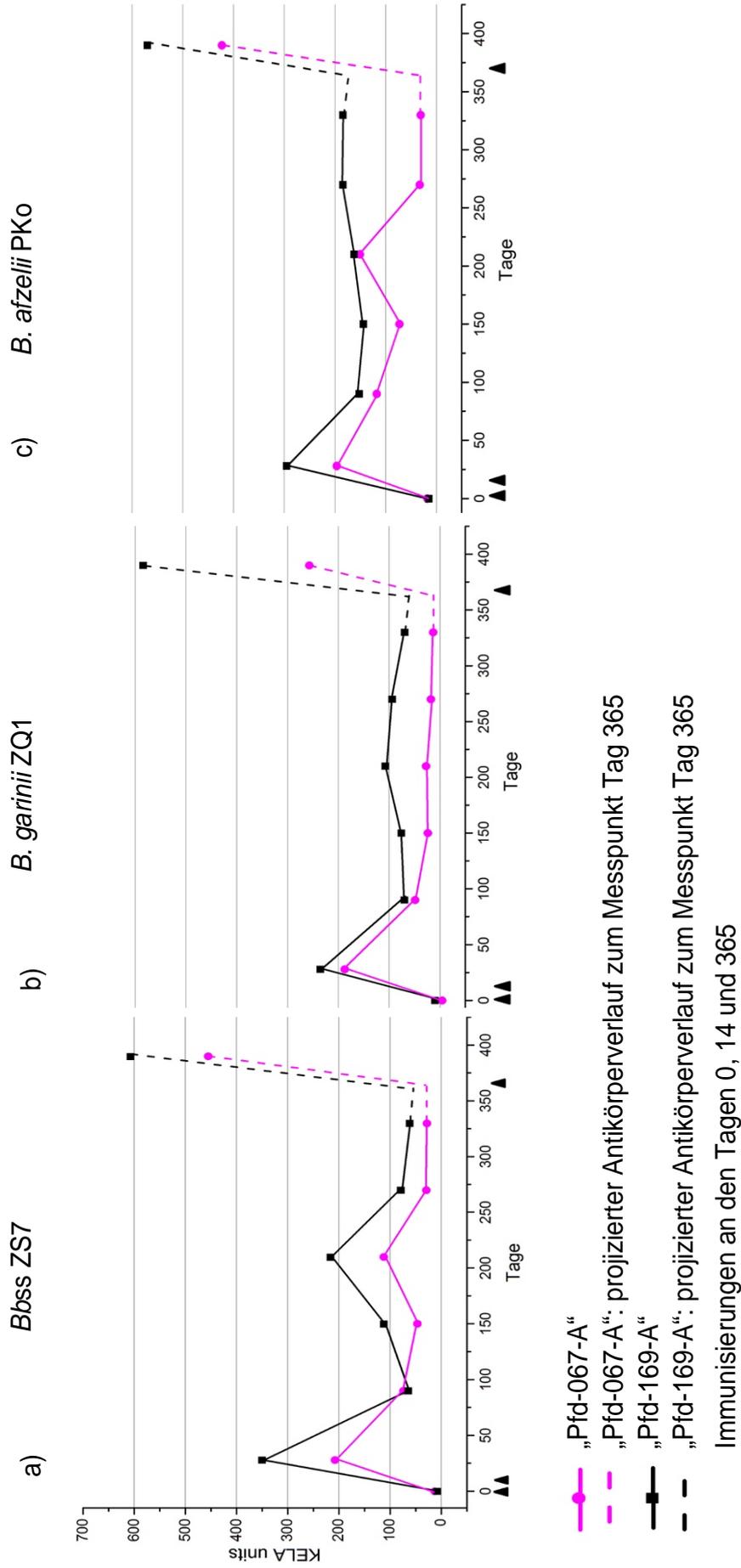


Abbildung 11a-c

Darstellung des OspA-Antikörperverlaufs nach Immunisierung von zwei Pferden aus der Gruppe A, nachgewiesen mit rOspA der Genospezies *Bbss ZS7*, *B. garinii ZQ1* und *B. afzelii PKo*

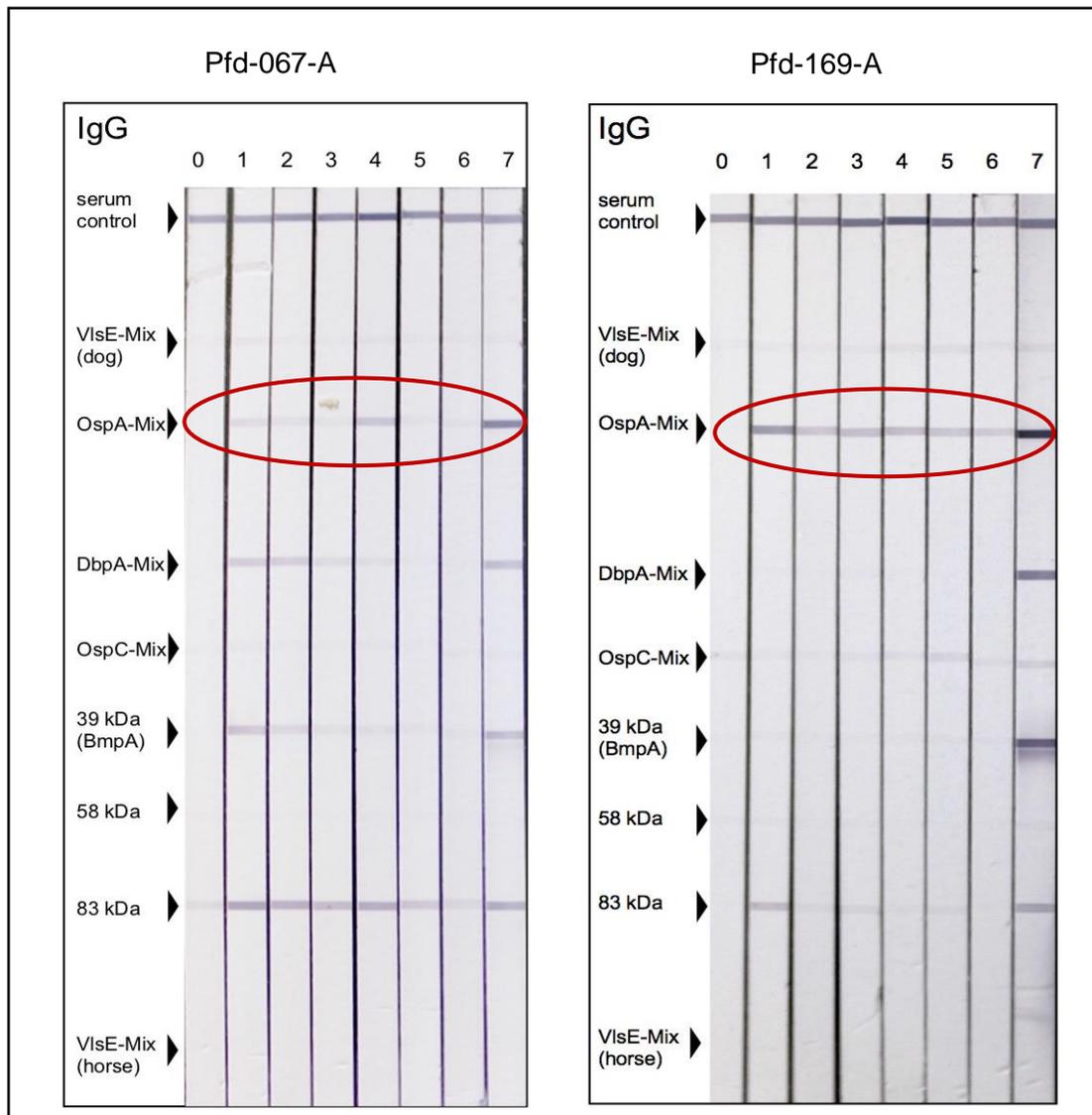


Abbildung 12

Die Antikörperproduktion von zwei Pferden aus der Gruppe A nach zweimaliger Immunisierung, dargestellt durch den Borrelia Veterinär plus OspA LINE

- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: 14 Tage nach der zweiten Impfung
- 2-6: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen
- 7: letzte Blutprobenentnahme, 28 Tage nach Auffrischungsimpfung

4.4 Nachweis von Infektionen mit *Bbsl* Organismen

4.4.1 Infektionen nicht-immunisierter Pferde

4.4.1.1 KELA-Ergebnisse

Bei der Bestimmung des *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörpergehaltes mittels KELA ist innerhalb der nicht-immunisierten Kontrollgruppe C ein Pferd mit atypischen Antikörperverlauf aufgefallen. Während des Untersuchungszeitraums waren bei 42 von 43 Pferden aus der Gruppe C zu jedem Untersuchungszeitpunkt niedrige Antikörperspiegel nachweisbar. Wie in der Abbildung 13 ersichtlich ist, konnte bei der serologischen Analyse des Pferdes „Pfd-139-C“ ab dem Tag 150 eine Zunahme des Antikörperrniveaus ermittelt werden. Während für das Tier zu Beginn der Untersuchungsreihe ein durchschnittlicher Gesamtantikörpergehalt in Höhe von 150 KELA units gemessen werden konnte, wurde 330 Tage nach Untersuchungsbeginn ein Antikörperpeak in Höhe von 348 KELA units erreicht. Über einen Zeitraum von 8 Monaten entspricht dies einer Zunahme des Antikörperspiegels um insgesamt 198 KELA units. Die anderen aus der Gruppe C getesteten Pferde zeigten dagegen einen zu erwartenden relativ konstanten *Bbsl*-spezifischen Antikörperverlauf.

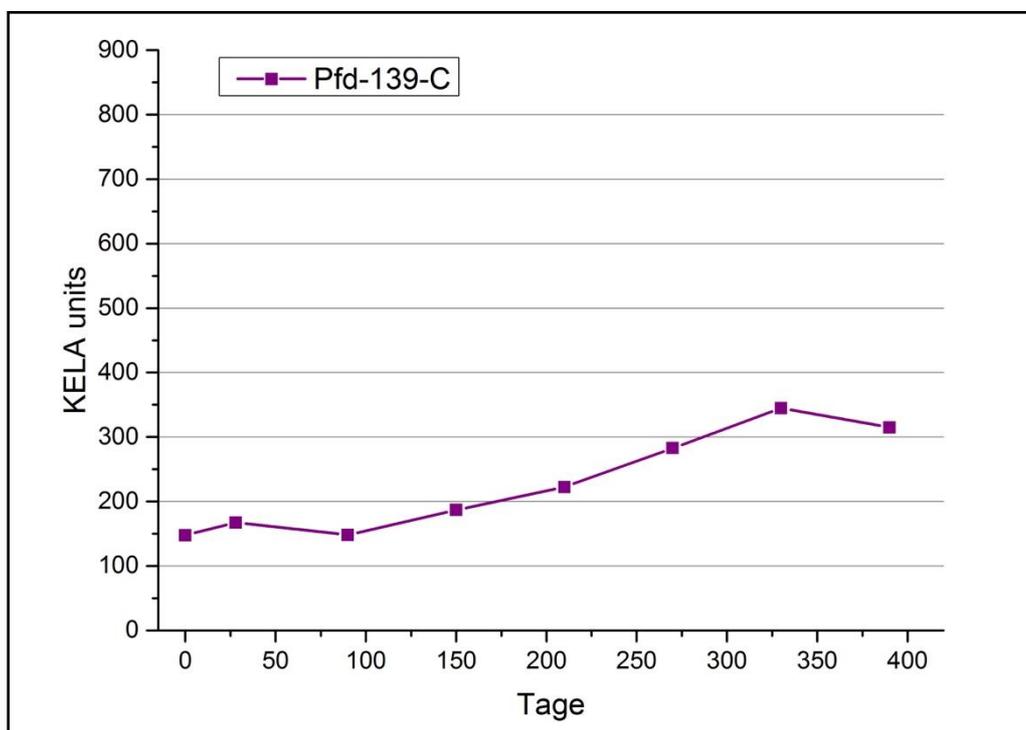


Abbildung 13

Darstellung des Gesamtantikörperverlaufes eines nicht-immunisierten Pferdes aus der Kontrollgruppe C, nachgewiesen mit *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und ohne Standardfehler

4.4.1.2 Ergebnisse des *Borrelia Veterinär plus OspA* LINE

Zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort des Pferdes „Pfd-139-C“ wurde der *Borrelia Veterinär plus OspA* LINE durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 14 dargestellt. Die Proben 0 - 3 (Tag 0-150) ließen lediglich schwach gefärbte Banden bei dem Antigen p83 erkennen. Die Signalstärke war jedoch geringer ausgeprägt als die Farbintensität des „Cut-off“, weshalb die aufgetretenen Banden bei der Auswertung keine Berücksichtigung fanden. Die Serumprobe 4 (Tag 210) hingegen zeigte neben einer intensiveren Farbentwicklung bei dem Protein p83 auch Signale bei den Antigenen p39, p58 und „VisE-Mix (horse)“. Die Anzahl und Intensität der Banden blieb bis zum Ende des Untersuchungszeitraums unverändert und gilt als Marker für eine Infektion mit *Bbsl*. Innerhalb der Kontrollgruppe C konnten anhand der Untersuchung mit dem LIA keine weiteren Pferde mit infektionsspezifischen Signalen beobachtet werden.

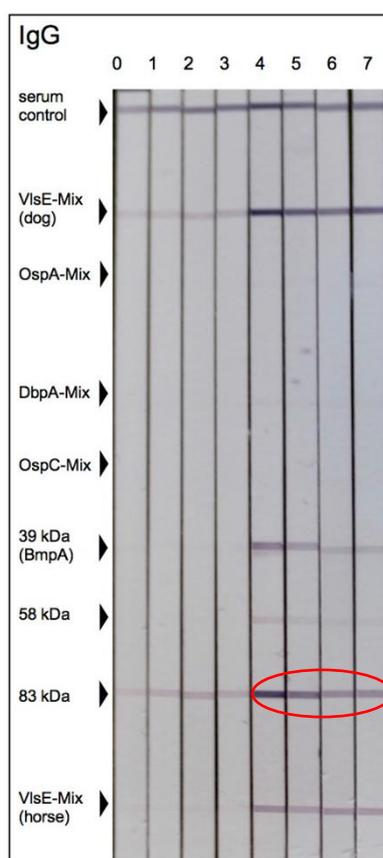


Abbildung 14

Darstellung der qualitativen Antikörperantwort der Serumprobe „Pfd-139-C“ durch den *Borrelia Veterinär plus OspA* LINE

0-7: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen

4.4.2 Infektionen nach Impfung gegen *Bbsl*

4.4.2.1 KELA-Ergebnisse

Bei der serologischen Untersuchung der Impfgruppe A mittels mit *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* beschichteten KELA-Platten sind zwei Pferde aufgefallen, die nach Immunisierung mit EquiLyme® einen im Vergleich zum Rest der Gruppe A atypischen Antikörperverlauf aufwiesen. In der Abbildung 15 sind die Ergebnisse des KELA-Verfahrens nach Analyse der beiden abweichenden Pferdeseren „Pfd-132-A“ und „Pfd-141-A“ dargestellt. Während die anderen Pferde aus der Gruppe A nach zweimaliger Antigenverabreichung innerhalb von zwei Wochen, wie erwartet, zunächst mit einem Antikörperanstieg und einem darauffolgenden Rückgang der *Bbsl*-spezifischen Antikörper reagierten, zeigten die Pferde „Pfd-132-A“ und „Pfd-141-A“ ein kontroverses Verhalten. Nach zweimaliger Immunisierung innerhalb von zwei Wochen konnte bei beiden Tieren ein Anstieg des Gesamtantikörpergehaltes beobachtet werden. Während bei der Serumprobe „Pfd-141-A“ innerhalb von 150 Tagen nach Erstimmunisierung eine Abnahme der borrelienspezifischen Antikörper um 250 KELA units verzeichnet werden konnte, kam es anschließend zu einem stetigen Anstieg des Antikörperniveaus. Bei der quantitativen Antikörperanalyse des Pferdes „Pfd-141-A“ konnte 330 Tage nach Erstimmunisierung ein Wert von 500 KELA units gemessen werden. Nach der Booster-Impfung am Tag 365 stiegen die *Bbsl*-spezifischen Antikörper des Pferdes „Pfd-141-A“ nochmals um 80 KELA units an. Das Pferd „Pfd-132-A“ zeigte binnen der ersten 150 Tage nach initialer Immunisierung eine für die Impfung typische Antikörperantwort. Dagegen war in den darauffolgenden 60 Tagen eine signifikante Zunahme der borrelienspezifischen Antikörper um 200 KELA units wahrzunehmen. Dieses Antikörperniveau blieb bis zur Auffrischungsimpfung nach einem Jahr relativ konstant. In Folge der Booster-Impfung kam es zu einem weiteren Anstieg des Antikörperspiegels um knapp 80 KELA units. Während des gesamten Untersuchungszeitraums konnten sowohl bei Pferd „Pfd-141-A“ als auch bei dem Tier „Pfd-132-A“ anhand des klinischen Erscheinungsbildes keine Anzeichen für eine Infektion mit *Bbsl* festgestellt werden. Abgesehen von den beiden geschilderten Serumproben konnten in den Impfgruppen A und B bei keinem weiteren Pferd Serokonversionen festgestellt werden.

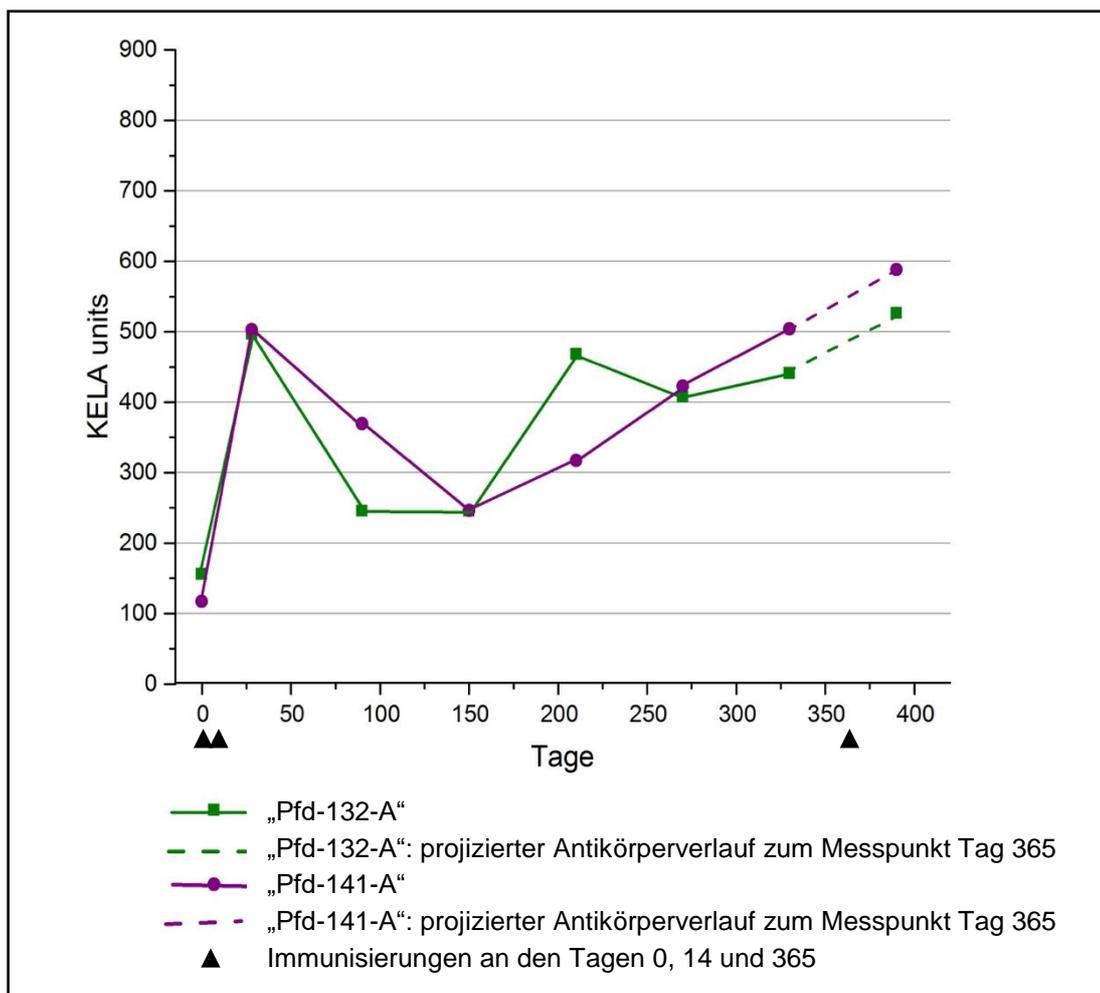


Abbildung 15

Darstellung der Antikörperverläufe von zwei Pferden aus der Gruppe A nach Immunisierung, nachgewiesen mit *Bbss*-Lysat und rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme), mit Hintergrund und ohne Standardfehler

4.4.2.2 Ergebnisse des *Borrelia* Veterinär plus OspA LINE

Aufgrund der überraschenden Ergebnisse im KELA-Verfahren wurde ein großes Augenmerk auf die qualitative Antikörperanalyse der Serumproben „Pfd-132-A“ und „Pfd-141-A“ mit dem LIA gelegt. Die Untersuchung der nach Impfung mit EquiLyme® induzierten Antikörperantwort ist in der Abbildung 16 ersichtlich. Bei Betrachtung der Serumprobe „Pfd-141-A“ ist ab dem Zeitpunkt 4, welcher der Blutprobenentnahme 210 Tage nach erster Antigenverabreichung entspricht, eine deutliche Zunahme der Bandenintensität bei dem Proteinen p83 und festzustellen. Zu diesem Zeitpunkt ist ein Signal bei „VisE-Mix (horse)“ erkennbar, welches im verwendeten Testverfahren als Hinweis für eine Infektion mit *Bbsl* anzusehen ist. Die Bande bei dem Protein „VisE-Mix (horse)“ ist bei der Serumprobe „Pfd-141-A“ in abgeschwächter Intensität bis zum Ende des Un-

tersuchungszeitraums nachweisbar. Bei der qualitativen Analyse der durch Impfung induzierten Antikörperantwort des Pferdes „Pfd-132-A“, kann ab dem Zeitpunkt 4 ebenfalls ein Signal bei dem Protein „VisE-Mix (horse)“ beobachtet werden. Neben dieser Bande ist 210 Tage nach Erstimmunisierung ein schwaches Signal bei dem Antigen „DbpA“ zu beobachten. Bei Betrachtung der Probe zum Zeitpunkt 1 (28 Tage nach initialer Immunisierung) fällt auf, dass im Serum des Pferdes „Pfd-132-A“ trotz erfolgter Grundimmunisierung keine OspA-Antikörper detektiert werden konnten. Dagegen führte die Booster-Impfung, die 365 Tage nach erster Antigenapplikation erfolgte, neben einer Zunahme der Signalstärke bei dem Protein p39 zu einer deutlichen Farbentwicklung bei dem Antigen OspA.

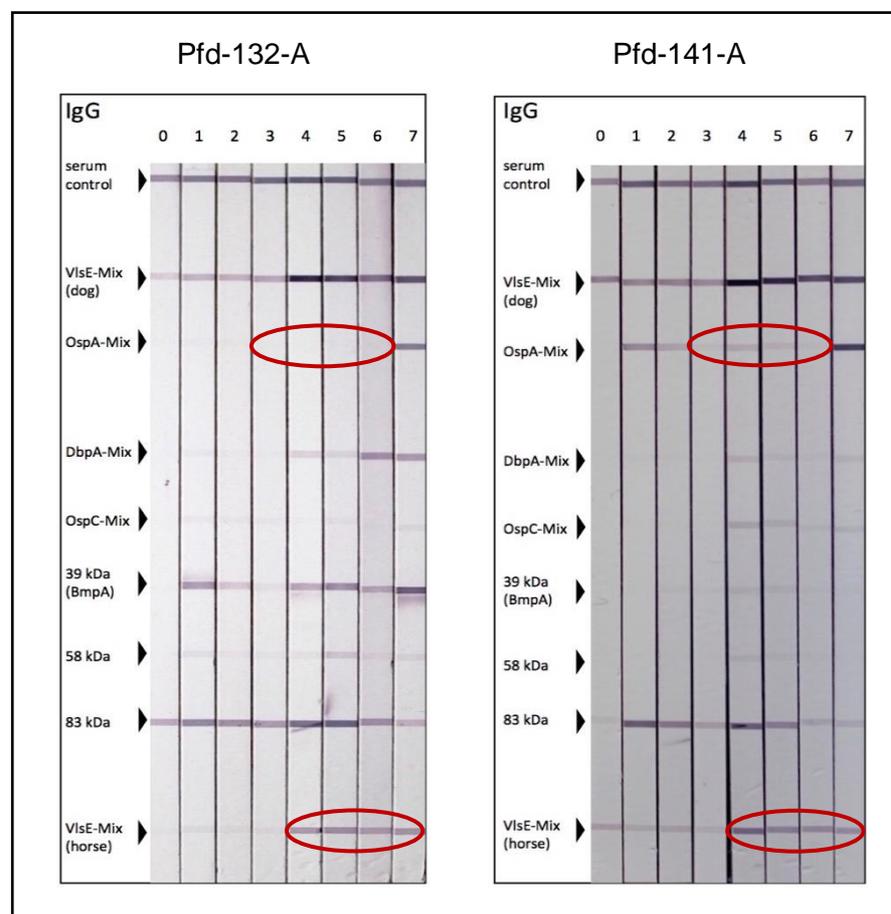


Abbildung 16

Die Antikörperantwort von zwei Pferden aus der Gruppe A nach zweimaliger Immunisierung mit EquiLyme®, dargestellt anhand des Borrelia Veterinär plus OspA LINE

- 0: Zeitpunkt vor der ersten Impfung
- 1: 14 Tage nach der zweiten Impfung
- 2-6: Blutprobenentnahmen in zweimonatigen Intervallen
- 7: letzte Blutprobenentnahme, 28 Tage nach Auffrischungsimpfung

5 Diskussion

Aus der Humanmedizin ist bereits bekannt, dass im Verlauf der Impfung gegen die LB eine dritte Antigenapplikation innerhalb von sechs Monaten nach der Erstimmunisierung zu einer Steigerung des Infektionsschutzes gegen die LB führt (VAN HOECKE et al., 1999). Die Einflussnahme einer dritten Immunisierung mit diversen, für Hunde verfügbaren Lyme-Vakzinen, konnte von TÖPFER et al. (2007) anhand einer mit Hunden angelegten Impfstudie nicht eindeutig aufgezeigt werden. Demnach führt eine dritte Impfung innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Grundimmunisierung im Vergleich zu einer zweimaligen Immunisierung zu einem leichten Anstieg der OspA-Antikörperspiegel. Da für das Pferd erst seit dem Jahr 2015 ein Impfstoff gegen die LB verfügbar ist, war ein Ziel dieser Studie, den Einfluss einer zusätzlichen Antigenapplikation innerhalb von sechs Monaten nach der Grundimmunisierung zu ermitteln und anhand der Ergebnisse eine Impfeempfehlung abzugeben. Aus diesem Grund wurde die zur Verfügung stehende Pferdepopulation in zwei Impfgruppen eingeteilt, die sich in Form von verschiedenen Impfzeitplänen voneinander unterschieden. Ein weiterer Aspekt dieser Studie war die Ermittlung der Effizienz der Vakzine EquiLyme® im Hinblick auf eine *Bbsl*-spezifische Gesamtantikörperinduktion. Diesbezüglich wurde innerhalb der Pferdepopulation eine Kontrollgruppe gebildet, die mit den beiden Impfgruppen verglichen wurde. Zur Ermittlung der humoralen Immunantwort gegen die im europäischen Raum vorkommenden und im Impfstoff enthaltenen Genospezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii* wurde ferner die speziesspezifische OspA-Antikörperinduktion in den Pferden analysiert.

Zu Beginn der Untersuchungsreihe wurden 194 Serumproben auf das Vorhandensein von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern untersucht. Wie DIVERS et al. (2018) berichteten, existieren aus den USA nur wenige aussagekräftige Daten über den Borrelien-Infektionsstatus bei Pferden, da in vielen serologischen Untersuchungen lediglich Pferde berücksichtigt wurden, die bereits klinische Anzeichen einer LB aufwiesen. Dementsprechend beträgt die Seroprävalenz abhängig vom verwendeten Nachweisverfahren und der selektierten Pferdepopulation bis zu 94 %. Bei der Analyse von klinisch unauffälligen Pferden in Nordamerika konnte eine regional abweichende Seroprävalenz von borrelienspezifischen Antikörpern zwischen 14,8 % und 45 % ermittelt werden (MAGNARELLI et al., 2000; METCALF et al., 2008). Richtet man ein Augenmerk auf den europäischen Raum, so beträgt die Seroprävalenz für *Bbsl* bei Pferden in Schweden 16,6 % (EGENVALL et al., 2001), während in Rumänien und Belgien in 11,92 % und 22 % der Pferdeseren borrelienspezifische Antikörper nachgewiesen wurden (KISS et al., 2011; MEERSCHAERT et al., 2016). Für das Vorkommen von *Bbsl*-spezifischen Antikörpern in der

Pferdepopulation in Deutschland existieren derzeit keine wissenschaftlich geprüften Daten.

Die Pferdeseren in dieser Studie wurden aus dem bayerischen Raum gewonnen und mit dem hauseigenen KELA und LIA, untersucht. Mit Hilfe des Zwei-Stufen-Tests konnten in 13,4 % der getesteten Pferde *Bbsl*-spezifische Antikörper detektiert werden. Der Borrelia Veterinär plus OspA LINE ermöglichte eine qualitative Analyse der in den Serumproben vorhandenen, gegen *Bbsl* gerichteten Antikörper. Dadurch konnte die Art der induzierten Antikörper präzisiert und infolgedessen immunisierte von infizierten Pferden unterschieden werden. Aufgrund der ermittelten Seroprävalenz und des stetig wachsenden Infektionsdruckes in den Zeckenendemiegebieten (FINGERLE et al., 2008) ist neben der regelmäßigen Zeckenkontrolle die Vakzinierung von Pferden gegen die LB eine mögliche Prophylaxemaßnahme.

Anhand des Zwei-Stufen-Tests konnten 168 seronegative und schwach grenzwertige Pferde ermittelt werden. Nach Einverständniserklärung der Besitzer wurden 143 Pferde in die Studie aufgenommen. Die in regelmäßigen Abständen durchgeführten Analysen der Pferdeseren erfolgte mit dem hauseigenen KELA und LIA. Die Beschichtung der KELA-Platten mit Antigen stammend aus *Bbss* N40 erlaubte die Quantifizierung des *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörpergehaltes in den Pferdeseren. Durch das zusätzliche Aufbringen von rOspA aus *Bbss* (Recombitek® Lyme) wurde ferner die maximale Erfassung der *Bbsl*-spezifischen OspA-Antikörperantwort infolge der Immunisierung ermöglicht. Mit dem auf diese Weise durchgeführten KELA-Verfahren konnten jedoch nur Aussagen über die Menge der in den Pferdeseren vorhandenen borrelienspezifischen Gesamtantikörpern gemacht werden. Zur Analyse der impfspezifischen Antikörperantwort wurden KELA-Platten ferner ausschließlich mit reinem rekombinanten OspA der Spezies *Bbss*, *B. garinii* oder *B. afzelii* beschichtet. Dadurch konnte sowohl eine Quantifizierung des OspA-Antikörpergehaltes ohne Hintergrund als auch eine speziesspezifische OspA-Antikörperdetektion erfolgen. Im Zusammenhang mit dem Borrelia Veterinär plus OspA LINE konnte darüber hinaus das Antikörperspektrum nach Immunisierung des Pferdes aufgezeigt werden.

Die Quantifizierung des Gesamtantikörpergehaltes führt zunächst zu einem Ergebnis, das nach Impfung gegen die LB zu erwarten war. Eine zweimalige Antigenverabreichung induziert ein maximales Antikörperviveau. Im Anschluss sinkt der Antikörperspiegel ab und erreicht zum Zeitpunkt der Auffrischungsimpfung minimale Werte. Die erneute Immunisierung resultiert wiederum in einem Antikörperanstieg. Um eine Borrelioseimpfung beurteilen zu können, ist es erforderlich, die im Serum vorhandenen Antikörper zu quantifizieren und das Antikörperspektrum nach Impfung aufzuzeigen.

Nach einer Infektion mit Borrelien werden im Wirt Antikörper produziert, die gegen OspC gerichtet sind. Dieses Oberflächenprotein wird von den Bakterien exprimiert, um die Wanderung vom Zeckendarm zur Speicheldrüse zu vollziehen und schließlich eine Übertragung auf den Wirt zu ermöglichen. Vor der Blutmahlzeit tragen die im Zeckendarm befindlichen Mikroorganismen jedoch hauptsächlich das Antigen OspA auf ihrer Oberfläche. Aus diesem Grund können Antikörper gegen OspC, die von der Zecke im Zuge der Blutmahlzeit am Wirtstier aufgenommen werden, keine Neutralisation der Borrelien innerhalb der Zecke bewirken. Die Immunisierung des Wirtes bewirkt dagegen eine Antikörperinduktion gegen das OspA. Aufgenommen mit dem Blut des Wirtstieres führen gegen OspA gerichtete Antikörper bereits innerhalb der Zecke zu einer Immobilisierung der Borrelien (GIPSON & DE SILVA, 2005). Von einem Infektionsschutz kann jedoch nur ausgegangen werden, wenn der Wirt einen ausreichend hohen Antikörperspiegel gegen OspA aufweist (GOLDE et al., 1997). Durch eine Erregerexposition findet keine natürliche Auffrischung des OspA-spezifischen Antikörpergehaltes statt, da bei der Übertragung der Borrelien von der Zecke auf den Wirt OspC als Oberflächenantigen dominiert. Somit muss infolge einer Immunisierung gegen die LB eine ausreichende OspA-Antikörperantwort im Pferd induziert werden, damit die Borrelien im Zeckendarm während der Blutmahlzeit der Zecke absterben (FIKRIG et al., 1992). Für eine Aussage über die Wirksamkeit von EquiLyme® ist es demnach unerlässlich, die durch Immunisierung induzierte OspA-spezifische Antikörpermenge über den Zeitraum von einem Jahr zu evaluieren und die Antikörperqualität nach Impfung zu analysieren.

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse des KELA, so ist nach der Grundimmunisierung, bestehend aus einer zweimaligen Impfung innerhalb von 14 Tagen, in beiden Impfgruppen ein Anstieg der borrelienspezifischen Antikörper zu beobachten, während bei der nicht-immunisierten Kontrollgruppe ein weitestgehend unveränderter Antikörpergehalt wahrzunehmen ist. In den ersten sechs Monaten nach Grundimmunisierung kommt es sowohl bei Gruppe A als auch bei Gruppe B zu einem raschen Antikörperabfall. Durch die zusätzliche Auffrischungsimpfung der Gruppe B, die sechs Monate im Anschluss an die initiale Immunisierung erfolgte, kann ein neuer maximaler Antikörperspiegel erreicht werden. Verglichen mit einer zweimaligen Immunisierung bewirkt die dritte Antigenverabreichung signifikant höhere Antikörperspiegel, die im weiteren Zeitverlauf langsamer abfallen. Die 365 Tage nach der Erstimmunisierung durchgeführte Auffrischungsimpfung resultiert bei beiden Impfgruppen in absoluten Maximalwerten. Die Antikörpergehalte der Impfgruppe A stiegen um mehrere Hundert KELA units an, obwohl sich das Antikörperniveau vor Durchführung der Auffrischungsimpfung nur knapp über dem Ausgangsniveau bewegt. Für die Pferde innerhalb der Gruppe B können 330 Tage nach Erstimmunisierung bereits Werte von fast 600 KELA units gemessen werden. Durch die vierte

Antigenapplikation innerhalb von zwölf Monaten wird das Antikörperniveau innerhalb der Gruppe B jedoch erneut angehoben. Somit spricht das humorale Immunsystem auch auf kürzere Impfabstände an und reagiert mit einer erneuten Antikörperproduktion. Aus der aufgezeigten Antikörperkinetik lässt sich ableiten, dass eine zweimalige Immunisierung mittels EquiLyme® hohe *Bbsl*-spezifische Antikörperspiegel in Pferden induziert, die aber rasch abfallen.

Der *Borrelia Veterinär plus OspA LINE* ermöglichte die qualitative Erfassung der nach Impfung mit EquiLyme® gebildeten Antikörper. Bei serologischer Analyse der immunisierten Pferde können hauptsächlich Antikörper gegen das OspA der Borrelien detektiert werden. Wie es bei Lysatvakzinen zu erwarten ist (STRAUBINGER et al., 2001), weisen die Serumproben auch Antikörper gegen die Borrelien-Antigene p39, p58, p83 und OspC auf.

Die Antikörperkinetik der Gruppe B lässt die positive Wirkung einer dritten Immunisierung innerhalb von sechs Monaten nach Grundimmunisierung deutlich erkennen. Abweichend von der derzeitigen Impfpflicht führt die zusätzliche Antigenverabreichung bei den Pferden zu signifikant höheren Antikörperspiegeln. Im weiteren Zeitverlauf kann innerhalb der Gruppe B ein länger anhaltend hohes Antikörpurniveau beobachtet werden. Somit ist bei diesem Impfreime während des ersten Jahres der Immunisierung ein speziesspezifischer Infektionsschutz zu erwarten.

Da die Ergebnisse des KELA lediglich die Höhe der borrelienspezifischen Gesamtantikörper wiedergeben und der LIA als semiquantitatives Nachweisverfahren kein geeignetes Messinstrument darstellt, wurde zur Quantifizierung der in den Pferdeseren vorhandenen impfinduzierten OspA-Antikörperfraktionen das KELA-Verfahren modifiziert. Dazu wurden KELA-Platten anstelle von *Bbss*-Lysat mit reinem rekombinanten OspA der Spezies *Bbss* ZS7, *B. garinii* ZQ1 oder *B. afzelii* PKo beschichtet. Anschließend folgte die quantitative Bestimmung des OspA-spezifischen Antikörpergehaltes in den Serumproben von jeweils acht Pferden aus den Gruppen A, B und C. Somit wurden insgesamt 24 Pferde, die repräsentativ für die Gesamtpopulation sind, mit diesem Testverfahren untersucht.

Durch die Verwendung von rOspA der Spezies *Bbss* ZS7 wurde zunächst die Wirksamkeit von EquiLyme® im Hinblick auf eine OspA-Antikörperinduktion gegen diese Genospezies ermittelt. Während in der Kontrollgruppe C während des gesamten Untersuchungszeitraumes keine OspA-spezifische Antikörperantwort erkennbar ist, führt die Grundimmunisierung mit EquiLyme® in beiden Impfgruppen zu einer stark ausgeprägten humoralen Immunantwort gegen OspA. In der Gruppe A ist bereits sieben Monate nach der Grundimmunisierung kein protektiver Antikörpergehalt mehr nachweisbar. Zum Zeitpunkt niedriger Antikörperspiegel führt die zusätzliche Immunisierung der Gruppe B

zu einem deutlichen Antikörperanstieg, der bis zur Auffrischungsimpfung auf einem hohen Niveau bleibt. Über einen Zeitraum von zwölf Monaten kann somit von einem Infektionsschutz ausgegangen werden. Dagegen ist bei den entsprechend der derzeitigen Impfpflicht geimpften Pferden der Gruppe A lediglich über einen Zeitraum von sechs Monaten nach Grundimmunisierung davon auszugehen, dass die OspA-Antikörper eine protektive Wirkung gegen *Bbss* erzielen.

Die quantitative Erfassung der *B. afzelii*-spezifischen OspA-Antikörper mittels homolog beschichteten KELA-Platten liefert für die Kontrollgruppe C während des Untersuchungszeitraums ebenfalls keine positiven Ergebnisse. In den immunisierten Pferden ist der gemessene Maximalgehalt nach der Grundimmunisierung mit dem Niveau der *Bbss*-spezifischen OspA-Antikörper vergleichbar. Obwohl die gegen *B. afzelii* gerichteten Antikörper ebenso rasch abfallen, können fünf Monate nach der Grundimmunisierung in beiden Impfgruppen noch geringe OspA-Antikörperspiegel gegen *B. afzelii* nachgewiesen werden. Wie anhand der Antikörperkinetik der Gruppe B ersichtlich ist, führt die zusätzliche Immunisierung nach sechs Monaten zu einem signifikanten Anstieg des Antikörperrniveaus, während die Gruppe A bis zur Auffrischungsimpfung nach zwölf Monaten keinen Antikörperzuwachs verzeichnen kann. Dies führt ebenfalls zu der Annahme, dass das derzeitige empfohlene Impfregime in Form einer zweimaligen Immunisierung innerhalb von zwei bis drei Wochen und einer Auffrischungsimpfung nach einem Jahr, im ersten Jahr der Immunisierung zu einem unzureichenden Infektionsschutz gegen *B. afzelii* führt.

Da der LB-Impfstoff für das Pferd auch OspA-spezifische Antikörper gegen *B. garinii* induzieren sollte, wurde die Höhe der OspA-Antikörper in den Pferdeseren mittels mit rOspA aus *B. garinii* ZQ1 analysiert. Aufgrund der mit dem OspA von *B. garinii* assoziierten Serotyp-Diversität (RUZIC-SABLJIC et al., 2002; FINGERLE et al., 2008; MARGOS et al., 2009) und der möglichen Verwendung eines anderen Stammes von *B. garinii* bei der Impfstoffherstellung, wurden die impfinduzierten Antikörper nicht im homologen System gemessen. Da OspA-spezifische Antikörper lediglich an ein bestimmtes Epitop des OspA binden (GOLDE et al., 1997), kann es im Zusammenhang mit dem OspA-Antikörpernachweis unter Verwendung von rOspA aus *B. garinii* ZQ1 somit zu einem natürlichen Detektionsverlust in Folge der Serotyp-Diversität des OspA innerhalb von *B. garinii* kommen. Obwohl in den Impfgruppen A und B nach zweimaliger Verabreichung von EquiLyme® hohe Antikörperspiegel vorhanden sind, sind diese im Vergleich zu dem *Bbss*- und *B.-afzelii*-spezifischen OspA-Antikörperrniveaus deutlich niedriger. In Folge des raschen Abfalls der OspA-spezifischen Antikörper in beiden Impfgruppen kann bereits fünf Monate nach der Grundimmunisierung von einem wahrscheinlich unzureichenden, auf einer Impfung basierenden, Infektionsschutz gesprochen werden.

Aufgrund der zusätzlichen Immunisierung, 180 Tage nach der ersten Antigenverabreichung, handelt es sich bei der Gruppe B lediglich um eine Lücke von zwei bis drei Monaten, in der von keinem Schutz vor einer Infektion mit *B. garinii* auszugehen ist. Dagegen sind die Tiere in der Gruppe A für einen Zeitraum von mehr als sieben Monaten trotz vollzogener Grundimmunisierung wahrscheinlich nicht ausreichend vor einer Borrelienerkrankung geschützt, da die Pferde in dieser Gruppe erst durch die Booster-Impfung einen Zuwachs des OspA-Antikörperrniveaus verzeichnen können. Anhand der aufgezeigten *B. garinii*-spezifischen OspA-Antikörperkinetik ist davon auszugehen, dass die zusätzliche Immunisierung innerhalb von sechs Monaten nach Grundimmunisierung von einem bis zur Auffrischungsimpfung anhaltenden speziesspezifischen Infektionsschutz führt.

Bei Analyse der Pferdeseren mit dem rOspA-KELA sind zwei Serumproben in der Gruppe A aufgrund eines atypischen Antikörperverlaufes aufgefallen. Nach zweimaliger Immunisierung weisen beide Serumproben einen maximalen Gehalt an OspA-spezifischen Antikörpern auf, der zunächst in den folgenden drei Monaten rasch abfällt, bevor es ohne zusätzliche Immunisierung zwischen vier und sieben Monaten nach der Erstimmunisierung zu einem erneuten Anstieg der *Bbss*- und *B. afzelii*-spezifischen OspA-Antikörper kommt (Abbildung 11a-c). Der *B. garinii*-spezifische Antikörperverlauf zeigt vier bis sieben Monate nach der Erstimmunisierung für beide Pferde nur geringgradige Diskrepanzen. Zur Ermittlung der um diesen Zeitraum in den Serumproben vorhandenen Antikörperqualität wurden die Proben parallel mit dem LIA untersucht (Abbildung 12). Abgesehen von einer 150 und 210 Tage nach Erstimmunisierung ersichtlichen Zunahme der OspA-Signalintensität bei den Pferden „Pfd-169-A“ und „Pfd-067-A“, sind keine atypischen oder infektionsspezifische Bandenmuster erkennbar. Da die Pferde lediglich zwei Immunisierungen innerhalb von 14 Tagen erhielten, kann der Anstieg der OspA-Antikörper nicht durch eine kürzlich durchgeführte Impfung begründet werden. Obwohl eine OspA-spezifische Antikörperantwort auch bei chronischen Krankheitsstadien der LB zu erwarten ist (LEVY et al., 1993), zeigt das im LIA ersichtliche Bandenmuster zu keinem Zeitpunkt Anzeichen für eine Infektion mit *Bb*sl. Eine andere Erklärung für die abweichende OspA-spezifische Antikörperkinetik liegt in der natürlichen Testschwankung. Da alle, über den gesamten Untersuchungszeitraum von den Pferden „Pfd-067-A“ und „Pfd-169-A“ gewonnenen Serumproben mehrmals zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels rOspA-KELA untersucht wurden, stellt dies keine Ursache für die abweichenden Ergebnisse dar.

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse des quantitativen OspA-spezifischen Antikörpernachweises die Wirksamkeit der Vakzine EquiLyme® im Pferd im Hinblick auf eine ausreichende Antikörperantwort gegen die Spezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii*

angenommen werden. Entgegen den Erkenntnissen von GUARINO et al. (2017) induziert die für Pferde zugelassene Lyme-Vakzine gegen alle drei Spezies eine hohe OspA-Antikörperantwort. Im Einklang mit den Erkenntnissen von TÖPFER et al. (2007) kann durch eine zusätzliche Immunisierung nach sechs Monaten ein speziesspezifischer Infektionsschutz über den Zeitraum von mindestens einem Jahr angenommen werden. Dagegen ist der durch EquiLyme® induzierte Impfschutz nach Anwendung des regulären für Totvakzinen empfohlenen Impfgregimes als fragwürdig zu beurteilen. Anhand der Ergebnisse im Borrelienlysat- und rOspA-KELA sind die Pferde nach zweimaliger Antigenverabreichung lediglich für einen Zeitraum von maximal fünf Monaten ausreichend geschützt, während die Pferde in den folgenden sieben Monaten unzureichende, vor einer Infektion schützende Antikörperspiegel aufweisen. Ein erhöhtes Infektionsrisiko ist gegeben, wenn die Pferde in Zeckenendemiegebieten gehalten werden und die Antikörperlücke zeitgleich mit einem saisonal bedingten Anstieg der Zeckenexposition einhergeht. Anhand von zwei Pferden aus der Gruppe A kann die Auswirkung eines unzureichenden Antikörperspiegels während eines hohen Zeckenaufkommens aufgezeigt werden. Nach zweimaliger Immunisierung innerhalb von 14 Tagen ist in den Pferdeseren „Pfd-132-A“ und „Pfd-141-A“ mittels Borrelienlysat-KELA zunächst ein Anstieg des *Bbsl*-spezifischen Gesamtantikörpergehaltes zu beobachten, welcher innerhalb von fünf Monaten rasch abfällt und sieben Monate nach der Erstimmunisierung wieder ansteigt (Abbildung 15). In den folgenden Monaten ist bis zur stattfindenden Auffrischungsimpfung ein andauernder Antikörperanstieg zu beobachten. Dieser Antikörperverlauf ist als Hinweis auf eine Infektion zu betrachten (STRAUBINGER et al., 2000). Da anhand des KELA nur eine quantitative Bestimmung der borrelienspezifischen Antikörperantwort möglich ist, wurde zur Bestätigung des Infektionsverdachtes der *Borrelia* Veterinär plus OspA LINE durchgeführt (Abbildung 16). Zum Zeitpunkt des im KELA erscheinenden Antikörperanstiegs erscheint bei Untersuchung der Serumprobe „Pfd-132-A“ als auch beim Pferd „Pfd-141-A“ ein Bandenmuster, das auf eine Infektion hinweist. Sieben Monate nach erster Immunisierung ist auf den Nitrozellulosestreifen eine Zunahme der Signalintensität bei dem Antigen „p83“ zu erkennen. Zusätzlich tritt eine Bande bei „VisE-Mix (horse)“ in Erscheinung. Weitere Signale sind bei den Proteinen „p39“, „DbpA-Mix“, „p58“ und „OspC-Mix“ zu beobachten. Dieses Bandenmuster ist in abgeschwächter Intensität bis zur Durchführung der Auffrischungsimpfung zu sehen und ist damit im Einklang mit den Beobachtungen im KELA. Die abschließende Immunisierung führt in beiden Pferden zu einem erneuten Anstieg des Antikörpervniveaus. Bei Analyse der durch die Immunisierung induzierten qualitativen Antikörperantwort fällt jedoch lediglich eine Zunahme der Signalstärke bei OspA auf. Dies spricht dafür, dass das humorale Immun-

system auf eine Immunisierung trotz Infektion mit einer OspA-spezifischen Antikörperantwort reagiert. Da die Pferde sowohl vor der Auffrischungsimpfung als auch im Anschluss daran keine klinischen Anzeichen einer LB aufwiesen, hat die Auffrischungsimpfung mit dem Lysatimpfstoff keinen Einfluss auf die bestehende Infektion genommen. Ein ähnliches Bild lieferte die serologische Untersuchung des Pferdes „Pfd-139-C“ aus der Kontrollgruppe C. Die Messung des Antikörperspiegels führt ab dem fünften Monat nach Studienbeginn zu ansteigenden Werten, die erst sieben Monate später leicht rückläufig sind (Abbildung 13). Bei der qualitativen Analyse der Antikörper kann sieben Monate nach Untersuchungsbeginn ein Bandenmuster detektiert werden, das für eine stattgefundene Infektion spricht (Abbildung 14). Auch hier tritt ein deutliches Signal bei „VlsE-Mix (horse)“ und „p39“ in Erscheinung. Zudem kann eine Zunahme der Bandenintensität bei „p83“ beobachtet werden.

Die serologische Untersuchung sieben Monate nach der Erstimmunisierung lieferte für die Pferde „Pfd-132-A“ und „Pfd-141-A“ erste Infektionshinweise. Da die Tiere innerhalb der Impfgruppe A fünf bis sechs Monate nach der Grundimmunisierung niedrige OspA-Antikörperspiegel aufweisen, ist anzunehmen, dass sich die beiden Pferde aufgrund eines unzureichenden protektiven OspA-Antikörperspiegels infiziert haben. Die zweimalige Immunisierung innerhalb von 14 Tagen wurde gemäß der Empfehlung des Impfstoffherstellers vor einer erhöhten Zeckenaktivität, im Dezember, durchgeführt. Somit befanden sich die OspA-spezifischen Antikörper ab dem Monat Mai auf einem niedrigen Niveau. Zu diesem Zeitpunkt ist im Zusammenhang mit einer Koppelhaltung die Zeckenexposition der Pferde sehr hoch, was wiederum eine Infektion mit *Bbsl* begünstigt. Da sich das nicht-immunisierte Pferd „Pfd-139-C“ aus der Kontrollgruppe C höchstwahrscheinlich ebenfalls im Mai oder Juni mit *Bbsl* infiziert hat, ist dies plausibel. Da bei allen drei Tieren keine Speziesisolierung und -identifikation aus den Geweben durchgeführt wurde, ist die Infektionsursache unbekannt. Ob eine zeitliche Verschiebung der Erstimmunisierung in den Monat April eine Infektion der geimpften Pferde aus der Gruppe A verhindert hätte, ist ungewiss, da auch in den Monaten August und September mit einem regional gehäuften Zeckenvorkommen gerechnet werden muss.

Zu Beginn des Untersuchungszeitraums wurden 99 Pferde mittels EquiLyme® zweimal innerhalb von 14 Tagen immunisiert. Anschließend erhielten 44 Pferde 180 Tage nach initialer Immunisierung eine dritte Antigenverabreichung, während 365 Tage nach Erstimmunisierung 83 Tiere erneut geimpft wurden. Somit wurden insgesamt 325 Impfstoffapplikationen an 99 verschiedenen Pferden durchgeführt. Obwohl der Impfstoffhersteller darauf verweist, dass die Antigenverabreichung in seltenen Fällen zu Fieber oder Schwellungen der Injektionsstelle und in sehr seltenen Fällen zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen kann, konnten die Besitzer in der durchgeführten Studie bei keinem

Pferd Nebenwirkungen beobachten. Lediglich ein Pferd entwickelte nach der letzten Immunisierung einen Abszess an der Injektionsstelle und musste daraufhin mit Penicillin, Gentamicin und nicht-steroidalen Antiphlogistika über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt werden. Da es sich hierbei um eine grundsätzlich nach Injektionen auftretende Komplikation handelt, ist die Abszedierung keine Folge der Impfstoffverabreichung. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sowohl der Gesamtantikörperspiegel als auch das OspA-Antikörperriveau nach der Grundimmunisierung rasch absinken und die geimpften Pferde bereits nach wenigen Monaten gegenüber einer Infektion mit *Bbsl* empfänglich sind. Dies konnte bereits anhand einer Impfstudie an Hunden bestätigt werden (TÖPFER, 2007). Dagegen konnte mit einer dritten Antigenverabreichung, die sechs Monate nach der Grundimmunisierung durchgeführt wurde, eine signifikante Erhöhung des Antikörperspiegels erzielt werden. Somit kann auch in den Folge Monaten ein schützender Antikörperspiegel aufrechterhalten werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist das derzeit empfohlenen Impfgeme mit einer zusätzlichen Immunisierung nach sechs Monaten zu ergänzen. Untersuchungen der durch EquiLyme® induzierten speziesübergreifenden Antikörperantwort ergaben sowohl ausreichende Antikörperspiegel gegen das OspA von *Bbss* als auch gegen das OspA von *B. garinii* und *B. afzelii*. Damit kann die Wirksamkeit der Lyme-Vakzine für Pferde im Hinblick auf eine Antikörperinduktion gegen OspA bestätigt werden und von einem adäquaten Impfschutz gegen die in Europa hauptsächlich vorkommenden Borrelienspezies ausgegangen werden. Obwohl eine Impfung gegen die LB des Pferdes eine wirksame Vorbeugemaßnahme darstellt, sind zur Minimierung des Infektionsrisikos mit *Bbsl* weitere Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen, die auf eine Zeckenabwehr abzielen. Auch im Hinblick auf durch Zecken übertragbare Co-Infektionen mit den Erregern *Anaplasma phagocytophilum* oder *Babesia caballi* ist es in erster Linie ratsam, die Pferde täglich auf anhaftende Zecken zu kontrollieren. Da die Wanderung der Borrelien vom Darm zur Speicheldrüse der Zecke mindestens 24 Stunden in Anspruch nimmt sollten die Arthropoden möglichst frühzeitig entfernt werden (PIESMAN et al., 2001). In Anbetracht der großen Körperoberfläche der Pferde gestaltet es sich schwierig, die Zecken aufzusuchen. Zusätzlich empfiehlt sich der Einsatz von Zeckenabwehrsprays. Für Pferde sind derzeit Produkte mit dem Wirkstoff Icaridin, einem synthetischen Repellent, kommerziell erhältlich.

6 Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose (LB) ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in Europa. Als Krankheitserreger fungieren Spirochäten des *Bbsl*-Komplexes. Obwohl eine langfristige Antibiotikatherapie zu einer Linderung der klinischen Erscheinungen führt, kann damit anhand von einer Vielzahl an Studien keine Erregerelimination belegt werden. Deshalb ist es umso wichtiger, geeignete Vorsorgemaßnahmen zu ergreifen. Aufgrund der großen Körperoberfläche des Pferdes gestaltet sich sowohl die adspektorische Zeckenkontrolle am Tier sowie die Zeckenabwehr mittels Sprays mit repellierenden Eigenschaften als problematisch. Aus diesem Grund stellt die Immunisierung gegen die LB mit dem weltweit einzigen kommerziell erhältlichen Impfstoff EquiLyme® für Pferde die nahezu einzige Prophylaxemaßnahme dar. Wie Studien aus der Humanmedizin zeigen, ist die Wirksamkeit einer Immunisierung jedoch nicht unumstritten: Bei zweimaliger Immunisierung kann der Impfschutz im ersten Jahr nur bei Zweidrittel der geimpften Menschen gewährleistet werden, wohingegen die dritte Antigenverabreichung bei nahezu allen Probanden zu einem ausreichenden Infektionsschutz führt. Anhand der mit Pferden durchgeführten Studie sollte das derzeitige empfohlene Impfregime im Hinblick auf eine ausreichende Antikörperantwort überprüft und die Auswirkung einer zusätzlichen Immunisierung auf die Höhe der Antikörper aufgezeigt werden. Höhere Antikörperspiegel führen zu einem länger anhaltenden, hohen Antikörperriveau und ermöglichen damit einen Impfschutz vor Infektion mit *Bbsl*. Zusätzlich sollte die Qualität der induzierten Antikörper charakterisiert und damit die Wirksamkeit des Impfstoffes im Hinblick auf eine speziesübergreifende Antikörperinduktion evaluiert werden.

In dieser Studie konnte eine Seroprävalenz von 13,4 % in der untersuchten bayerischen Pferdepopulation festgestellt werden, wobei lediglich 7 % der seropositiven Pferde während des Untersuchungszeitraums klinische Anzeichen einer LB aufwiesen.

EquiLyme® (Boehringer-Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany), der weltweit einzige kommerziell erhältliche Borreliose-Lysatimpfstoff für Pferde, enthält die Antigene der Spezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii* und wurde in seronegativ und schwach grenzwertig getesteten Pferden sowohl im Hinblick auf die induzierten Gesamtantikörper als auch auf die speziesspezifischen Antikörper gegen das OspA untersucht. Außerdem wurde durch die Anwendung von zwei unterschiedlichen Impfschemata der Einfluss einer zusätzlichen Immunisierung auf die nachweisbaren Antikörper ermittelt.

Zunächst konnte durch eine zweimalige Immunisierung ein hoher Gesamtantikörperspiegel gegen *Bbsl* erreicht werden. Im weiteren Zeitverlauf sanken die Antikörper jedoch rasch ab, was dazu führt, dass fünf Monate nach der Grundimmunisierung nur noch geringe Antikörperspiegel nachweisbar waren. Die dritte Immunisierung nach sechs Monaten führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg des Gesamtantikörperspiegels. In den Folgemonaten des Beobachtungszeitraumes führte die zusätzliche Antigenapplikation zu signifikant höheren Antikörperspiegeln. Ein ähnliches Ergebnis lieferte auch die Analyse der durch EquiLyme® induzierten OspA-spezifischen Antikörperantwort gegen die Genospezies *Bbss*, *B. garinii* und *B. afzelii*. Durch die Grundimmunisierung konnte sowohl gegen *Bbss* als auch gegen *B. afzelii* ein deutlicher OspA-Antikörperzuwachs beobachtet werden. Obwohl die OspA-spezifische Antikörperinduktion gegen *B. garinii* geringer ausgeprägt war, wurde nach der Impfung dennoch eine Immunantwort gegen diese Spezies festgestellt. Nachfolgend sanken die OspA-Antikörperspiegel gegen alle drei Spezies ab. Die gegen das OspA von *Bbss* und *B. afzelii* gerichteten Antikörper erreichen fünf Monate nach der Grundimmunisierung kaum nachweisbare Werte, während sich die OspA-spezifischen Antikörper gegen *B. garinii* bereits nach vier Monaten auf einem minimalen Niveau bewegen. Dagegen führte die dritte Antigenverabreichung nach sechs Monaten zu hohen und anhaltenden OspA-Antikörperspiegeln gegen alle drei Spezies.

Wie bereits aus vorhergehenden Studien bekannt ist, induziert eine Lyme-Vakzinierung lediglich eine geringe Kreuzprotektivität gegen heterologe Genospezies. Anhand der nach Immunisierung mittels EquiLyme® induzierten, speziesübergreifenden Immunantwort kann von einem Infektionsschutz sowohl gegen *Bbss*, als auch gegen *B. garinii* und *B. afzelii* ausgegangen werden. Lediglich ein Pferd wurde nach der letzten Antigenverabreichung in Form einer Abszedierung im Bereich der Injektionsstelle auffällig. Bei den restlichen immunisierten Pferden konnten seitens der Besitzer keine Nebenwirkungen beobachtet werden.

Neben der Impfung gegen die Erreger der LB dürfen zusätzliche Prophylaxemaßnahmen nicht vernachlässigt werden. Nach wie vor stellen sowohl die Vermeidung einer Zeckenexposition mittels Zeckenabwehrpräparaten als auch die tägliche adspektorische Kontrolle und frühestmögliche manuelle Entfernung der Zecken wichtige Maßnahmen zur Minimierung des Infektionsrisikos dar.

7 Summary

The Lyme-borreliosis is the most common tick related infectious disease in Europe. The causative agent are spirochetes of the *Bbsl*-complex. Although a longterm treatment with antibiotics improves clinical signs of Lyme-borreliosis, eradication of the borrelia in the host's tissues is not possible, as it has been reported in recently published studies. Therefore preventive measures become more important. Due to the large body surface of the horse both, the visual examination of tick bites and the use of repellent sprays against ticks are considered to be problematic. Therefore, the vaccination against Lyme-disease with EquiLyme® seems to be the only suitable prophylaxis measure available for horses. However, studies in human medicine about the effectiveness of immunization leads to controversy: Two immunizations within the first year protect only two thirds of the participants while an additional vaccination leads to protection of nearly all individuals. The goal of the study presented here was to evaluate the current vaccination schedule in order to induce sufficient antibody response and to determine the effect of an additional immunization with regard to higher antibody levels in horses. Maximum antibody levels are important for a delayed decrease of antibodies and therefore provide an extended protection from infection, as infection protection exclusively depends on high antibody levels. To evaluate the effectiveness of EquiLyme® in order to induce species-specific antibodies against *Bbsl* the different types of antibodies induced by immunization has to be characterized precisely.

The serological examinations in the study presented here show a seropositivity of 13.4 % in tested horses from Bavaria. During course of investigation only 7 % of seropositively tested horses showed clinical signs associated with Lyme-borreliosis.

EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany) is the only commercially available Lyme-vaccine for horses worldwide and consists of the species *Bbss*, *B. garinii* and *B. afzelii*. To evaluate the effectiveness of the Lyme-vaccine's potential to induce high antibody levels, seronegatively and weakly borderline tested horses were vaccinated and total antibody response as well as specific OspA-antibody response were determined. Furthermore, two different vaccination schedules were performed in order to show the effect of an additional immunization on the amount of antibody levels.

First of all, two immunizations induce high amounts of total antibodies against *Bbsl*. Afterwards total antibodies decrease rapidly and reach a minimum antibody level five months post-vaccination. However, the additional immunization on day 180 leads to a higher and longer-lasting total antibody level in the second half since beginning of the study. Compared to total antibody response after immunization the detection of OspA-specific antibodies against *Bbss*, *B. garinii* and *B. afzelii* showed similar results. The basic immunization induces a significant increase in OspA-antibodies against *Bbss* as well as against *B. afzelii*. Although the OspA-specific antibody level against *B. garinii* is less pronounced, there was a measurable humoral immune response. Afterwards the OspA-antibodies against all three species decreased. Five months post-vaccination OspA-specific antibodies against *Bbss* and against *B. afzelii* reached minimum values, while a sufficient high antibody level against *B. garinii* can be observed only during a period of four months after immunization. Nevertheless, high and long-lasting OspA-antibody response against all three borrelia-species can be observed following third immunization six months after initial immunization.

As it has been reported before, vaccination against Lyme disease only predicts species-specific protection. As EquiLyme® induces high antibody levels against *Bbss* as well as against *B. garinii* and *B. afzelii*, there can be assumed a species-specific infection protection. After immunization exclusively one horse developed an abscess in the area of the injection site. Among horse population no further side effects were observed by the owners after vaccination. Additionally to vaccination other preventive measures should be considered. Daily control of the horse and the removal of adherent ticks as well as the use of tick repellents are important measures to reduce the risk of infection with *Bbsl*.

8 Literaturverzeichnis

Ackermann R, Hörstrup P, Schmidt R. Tick-Borne Meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth). *The Yale Journal of Biology and Medicine* 1984; 57: 485-90.

Adeolu M, Gupta RS. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. no. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of Genetic and Molecular Microbiology* 2014; 105: 1049-72.

Adlhoch C, Poggensee G. Lyme Borreliose: Ein Situationsbericht aus den sechs östlichen Bundesländern 2007-2009. *Umwelt und Mensch - Informationsdienst* 2010; 2: 5-8.

Aguero-Rosenfeld ME, Nowakowski J, Bittker S, Cooper D, Nadelman RB, Wormser GP. Evolution of the Serologic Response to *Borrelia burgdorferi* in Treated Patients with Culture-Confirmed Erythema Migrans. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1-9.

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 484-509.

Akin E, Mc Hugh GI, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC. The Immunoglobulin (IgG) Antibody Response to OspA and OspB Correlates with Severe and Prolonged Lyme Arthritis and the IgG Response to P35 correlates with Mild and Brief Arthritis. *Infection and Immunity* 1999; 67: 173-81.

Akins DR, Bourell KW, Caimano MJ, Norgard MV, Radolf JD. A New Animal Model for Studying Lyme Disease Spirochetes in a Mammalian Host-adapted State. *J Clin Invest* 1998; 101: 2240-50.

Antonara S, Chafel RM, La France M, Coburn J. *Borrelia burgdorferi* adhesins identified using in vivo phage display. *Mol Microbiol* 2007; 66: 262-76.

Appel MJG. Lyme disease in dogs and cats. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1990; 12: 617-26.

Appel MJG, Allen S, Jacobson RH, Lauderdale T, Chang Y, Shin SJ. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 651-64.

Asch ES, Bujak DI, Weiss M, Peterson MG, Weinstein A. Lyme disease: an infectious and postinfectious syndrome. *Rheumatology* 1994; 21: 454-61.

Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS. Surveillance for Lyme Disease - United States, 1992-2006. *Division of Vector-Borne Infectious Diseases* 2008; 57: 1-9.

Balátová P, Kurzová Z, Hulínská D. Serology of Lyme Borreliosis in human granulocytic ehrlichiosis in 2005-2010. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 2011; 60: 74-6.

Barandika JF, Hurtado A, García-Sanmartín J, Juste R, Anda P, García-Pérez A. Prevalence of Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Questing Adult Ticks from Northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008; 8

Baranton G, Postic D, Saint G, Boerlin IP, Piffaretti JC, Assous M, Grimont PA. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. Nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1992; 42: 378-83.

Barbour AG, Burgdorfer W, Grunwaldt E, Steere AC. Antibodies of Patients with Lyme Disease to Components of the *Ixodes dammini* Spirochete. *J Clin Invest* 1983; 72: 504-15.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *J Biol Med* 1984; 57: 521-5.

Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* Species. *Microbiological Reviews* 1986; 50: 381-400.

Barth C, Straubinger RK, Krupka I, Müller E, Sauter-Louis C, Hartmann K. Comparison of different diagnostic assays for the detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies in dogs. *Vet Clin Pathol* 2014; 43: 496-504.

Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* 2016; 30 (2): 359-361.

Berende A, Ter Hofstede HJM, Vos FJ, Van Middendorp H, Vogelaar ML, Tromp M, Van der Hoogen FH, Donders ART, Evers AWM, Kullberg BJ. Randomized trial of longer-term therapy for symptoms attributed to Lyme disease. *N Engl J Med* 2016; 374: 1209-20.

Bergdlund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringnér A, Elmrud H, Carlsson M, Runehagen A, Svanborg C, Norrby R. An Epidemiologic Study of Lyme Disease in Southern Sweden. *N Engl J Med* 1995; 333: 1319-24.

Blevins JS, Norgard MV, Hagman KE. Assessment of decorin-binding protein A to the infectivity of *Borrelia burgdorferi* in the murine models of needle and tick infection. *BMC Microbiol* 2008; 8: 1471-2180.

Brehmer-Andersson E, Hovmark A, Asbrink E. Acrodermatitis Chronica Atrophicans: Histopathologic Findings and Clinical Correlations in 111 Cases. *Acta Derm Venerol* 1998; 78: 207-13.

Bronson SH, Scythes J, Macallister J, Wier A, Margulis L. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. *PNAS* 2009; 106: 18656-61.

Brouqui P, Bacellar F, Baranton G. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1108-32.

Bruckbauer HR, Preac-Mursic V, Fuchs R, Wilske B. Cross-Reactive Proteins of *Borrelia burgdorferi*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 1992; 11: 224-32.

Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme Disease - a tick borne spirochetosis? Science 1982; 216: 1317-9.

Burgess EC, Gillette D, Pickett JP. Arthritis and panuveitis as a manifestation of *Borrelia burgdorferi* infection in a Wisconsin pony. Journal of the American Veterinary Medical Association 1986; 189: 1340-2.

Burgess EC, Mattison M. Encephalitis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. Journal of the American Veterinary Medical Association 1987; 191: 1457-8.

Burkot TR, Piesman J, Wirtz RA. Quantification of the *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Protein A in *Ixodes Scapularis*: Fluctuations During The Tick Life Cycle, Doubling Times, and Loss While Feeding. J Infect Dis 1994; 170: 883-9.

Busch U, Will G, Hizo-Teufel C, Wilske B, Preac-Mursic V. Long-term in vitro cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains: influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. Research in Microbiology 1997; 148: 109-18.

Cadavid D, Bai Y, Hodzic E, Narayan K, Barthold SW, Pachner AR. Cardiac involvement in non-human primates infected with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Lab Invest 2004; 84: 1439-50.

Canica MM, Nato F, Du Merle L, Mazie JC, Baranton G, Postic D. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 1993; 25: 441-8.

Carroll JA, Cordova RM, Garon CF. Identification of 11 pH-Regulated Genes in *Borrelia burgdorferi* Localizing to Linear Plasmids. Infection and Immunity 2000; 68: 6677-84.

Casjens S. Borrelia Genoms in the Year 2000. Mol Microbiol 2000; 2: 401-10.

Casjens SR, Mongodin EF, Qiu WG, Dunn JJ, Luft BJ, Fraser-Liggett CM, Schutzer SE. Whole-genome sequences of two *Borrelia afzelii* and two *Borrelia garinii* Lyme disease agent isolates. J Bacteriol 2011; 193: 6995-6.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *MMWR Mortal Wkly Rep* 1995; 44(31): 590.

Chang Y-F, Novosol V, McDonough SP, Chang C-F, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Vaccination against lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A (rOspA) in horses. *Vaccine* 1999; 18: 540-8.

Chang YF, Appel MJG, Jacobson RH, Shin SJ, Harpending P, Straubinger RK, Patrican LA, Mohammed H, Summers BA. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1995; 63: 354-9.

Chang YF, Novosol V, Mc Donough SP, Chang C-F, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Experimental Infection of Ponies with *Borrelia burgdorferi* by Exposure to Ixodid Ticks. *Vet Pathol* 2000; 37: 68-76.

Chang YF, Ku YW, Chang CF, Chang CD, Mc Donough SP, Divers T, Pough M, Torres A. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol* 2005; 107: 285-94.

Collares-Pereira M, Baptista S, Quaresma A, Aires T, Kurtenbach K, Santos-Reis M, Nicholson M. Lyme Borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland-Portugal. *International Journal of Medical Microbiology* 2004; 293: 109-16.

Collins AM. IgG subclass co-expression brings harmony to the quartet model of murine IgG function. *Immunology and Cell Biology* 2016; 94: 949-54.

Costello JM, Alexander ME, Greco KM, Perez-Atayde AR, Laussen PC. Lyme Carditis in Children: Presentation, Predictive Factors, and Clinical Course. *Pediatrics* 2009; 123: 835-41.

Coughlin RT, Fish D, Mather TN, Ma J, Pavia C, Bulger P. Protection of dogs from Lyme disease with a vaccine containing outer surface protein (Osp) A, OspB, and the saponin adjuvant QS21. *J Infect Dis* 1995; 171: 1049-52.

Couper D, Margos G, Kurtenbach K, Turton S. Prevalence of *Borrelia* infection in ticks from wildlife in south-west England. *Veterinary Record* 2010; 167: 1012-4.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody Response in Lyme Disease: Evaluation of Diagnostic Tests. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-95.

Cutler SJ, Ruzic-Sabljić E, Potkonjak A. Emerging borreliae - Expanding beyond Lyme borreliosis. *Mol Cell Probes* 2017; 31: 22-7.

Dambach DM, Smith CA, Lewis RM, Van Winkle TJ. Morphologic, Immunohistochemical, and Ultrastructural Characterization of a Distinctive Renal Lesion in Dogs Putatively Associated with *Borrelia burgdorferi* Infection: 49 Cases (1987-1992). *Vet Pathol* 1997; 35: 85-96.

Dattwyler RJ, Volkman D, Halperin JJ, Luft BJ. Treatment of late Lyme borreliosis—randomised comparison of ceftriaxone and penicillin. *The Lancet* 1988; 331: 1191-4.

Dattwyler RJ. Lyme borreliosis: an overview of the clinical manifestations. *Laboratory Medicine* 1990; 21: 290-2.

De Silva AM, Fikrig E. Growth and Migration of *Borrelia burgdorferi* in Ixodes Ticks during Blood Feeding. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 53: 397-404.

Des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze T, Stafford KC, Fish D. Effect of Tick Removal on Transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* 2001; 183: 773-8.

Devilbiss BA, Mohammed HO, Divers TJ. Perception of Equine Practitioners Regarding the Occurrence of Selected Equine Neurologic Diseases in the Northeast Over a 10-Year Period. *Journal of Equine Veterinary Science* 2009; 29: 237-45.

DIN Deutsches Institut für Normung e.V. NM. Medizinische Mikrobiologie - Serologische und molekularbiologische Diagnostik von Infektionskrankheiten - Teil 44: Immunoblot (IB); Spezielle Anforderungen für den Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi*. 2005

Divers T, Gardner R, Madigan LE, Witonsky SG, Bertone JJ, Swinebroad EL, Schutzer SE, Johnson AL. *Borrelia burgdorferi* Infection and Lyme Disease in North American Horses: A Consensus Statement. J Vet Intern Med 2018; 32: 617-32.

Divers TJ. Equine Lyme Disease. Journal of Equine Veterinary Science 2013; 33: 488-92.

Diza E, Papa A, Vezyri E, Tsounis S, Milonas I, Antoniadis A. *Borrelia valaisiana* in Cerebrospinal Fluid. Emerging Infectious Diseases 2004; 10: 1692-3.

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. J Infect Dis 1993; 167: 392-400.

Dzierzecka M, Kita J. The use of chosen serological diagnostic methods in Lyme disease in horses. Part II. Western blot. Pol J Vet Sci 2002; 5: 79-84.

Earnhart CG, Marconi RT. Construction and analysis of variants of a polyvalent Lyme disease vaccine: approaches for improving the immune response to chimeric vaccinogens. Vaccine 2007; 25: 3419-27.

Earnhart CG, Buckles EL, Marconi RT. Development of an OspC-based tetravalent, recombinant chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. Vaccine 2007; 25: 466-80.

Ebani VV, Bertelloni F, Pinzauti P, Cerri D. Seroprevalence of *Leptospira spp.* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. Ann Agric Environ Med 2012; 19: 237-40.

Egenvall A, Franzen P, Gunnarsson A, Olsson Engvall E, Vagsholm I, Wikström U, Artusson K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia spp.* and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. . Prev. Vet. Med. 2001; 49: 191-208.

Eicken C, Sharma V, Klabunde T, Lawrenz MB, Hardham JM, Norris SJ, Sacchettini JC. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem 2002; 277: 21691-6.

Eisen L, Eisen RJ, Lane RS. Seasonal activity patterns of *Ixodes pacificus* nymphs in relation to climatic conditions Medical and Veterinary Entomology 2002; 16: 235-44.

Embers ME, Liang FT, Howell JK, Jacobs MB, Purcell JE, Norris SJ, Johnson BJB, Philipp MT. Antigenicity and recombination of VlsE, the antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*, in rabbits, a host putatively resistant to long-term infection with this spirochete. Federation of European Microbiological Societies 2007; 50: 421-9.

Embers ME, Narasimhan S. Vaccination against Lyme disease: past, present, and future. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2013; 3: 1-15.

Engstrom SM, Shopp E, Johnson RC. Immunoblot Interpretation Criteria for Serodiagnosis of Early Lyme Disease. J Clin Microbiol 1995; 33: 419-27.

Eshoo MW, Schutzer SE, Crowder CD, Carolan HE, Ecker DJ. Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. Expert Rev Mol Diagn 2013; 13: 875-83.

Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA. Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. Science 1990; 250: 553-6.

Fikrig E, Telford SR, Barthold SW, Kantor FS, Spielman A, Flavell RA. Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89: 5418-21.

Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. Expression of Outer Surface Protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. J Clin Microbiol 1995; 33: 1867-9.

Fingerle V, Liegl G, Munderloh U, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. Medical Microbiology and Immunology 1998; 187: 121-6.

Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte-Spechtel U, Gern L, Wilske B. Dynamics of Dissemination and Outer Surface Protein Expression of Different European *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Strains in Artificially infected *Ixodes ricinus* Nymphs. J Clin Microbiol 2002; 40: 1456-63.

Fingerle V, Wilske B. Mikrobiologische Diagnostik der Lyme-Borreliose / Microbiological diagnostics of Lyme borreliosis. LaboratoriumsMedizin 2007; 31: 141-8.

Fingerle V, Schulte-Spechtel U, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s. l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. . Int J Med Microbiol 2008; 298: 279-90.

Fingerle V. Die neuen mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards zur Lyme Borreliose (MiQ12). (Kongressbeitrag) Gesundheitswesen 2015 2015: 77-A36, DOI: 10.1055/s-0035-1562992.

Fomenko N, Stronin O, Khasnatinov M, Danchinova G, Bataa J, Goltsova N. Heterogeneity of the ospA gene structure from isolates of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* from Western Siberia and Mongolia. Molecular Genetics, Microbiology and Virology 2009; 24: 183-8.

Franke J, Kipp S, Flügel C, Dorn W. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks feeding on humans in Thuringia/Germany. International Journal of Medical Microbiology 2008; 298: 188-92.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb J, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S. Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. NATURE 1997; 390: 580-6.

Fritz CI (2018) Retrospektive Betrachtung serologischer Ergebnisse verschiedener Borrelien-Antikörper-Nachweisverfahren unter dem Aspekt einer möglichen Kategorisierung klinischer Befunde bei Equiden. Inaugural-Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München

Gerhards H, Wollanke B. Antikörpertiter gegen Borrelien bei Pferden im Serum und im Auge und Vorkommen der equinen rezidivierenden Uveitis (ERU). Berl Münch Wschr 1996; 109: 273-278.

Gern L, Zhu Z, Aeschlimann A. Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. Annales de Parasitologie Humaine et Coparée 1990; 65: 89-93.

Gern L, Hu CM, Voet P, Hauser P, Lobet Y. Immunization with a polyvalent OspA vaccine protects mice against *Ixodes ricinus* tick bites infected by *Borrelia burgdorferi* ss, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii*. *Vaccine* 1997; 15: 1551-7.

Gilmore RD, Piesman J. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infect Immun* 2000; 68

Gilmore RD, Jr., Howison RR, Dietrich G, Patton TG, Clifton DR, Carroll JA. The bba64 gene of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, is critical for mammalian infection via tick bite transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 7515-20.

Gipson CL, De Silva AM. Interactions of OspA Monoclonal Antibody C3.78 with *Borrelia burgdorferi* within Ticks. *Infection and Immunity* 2005: 1644-7.

Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V. Improvement of Lyme Borreliosis Serodiagnosis by a Newly Developed Recombinant Immunoglobulin G (IgG) and IgM Line Immunoblot Assay and Addition of VlsE and DbpA Homologues. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3602-9.

Golde WT, Kappel KJ, Dequesne G, Feron C, Plainchamp D, Capiou C, Lobet Y. Tick Transmission of *Borrelia burgdorferi* to Inbred Strains of Mice Induces an Antibody Response to P39 but Not to Outer Surface Protein A. *Infection and Immunity* 1994; 62: 2625-7.

Golde WT, Piesman J, Dolan MC, Kramer M, Hauser P, Lobet Y, Capiou C, Desmons P, Voet P, Dearwester D, Frantz JC. Reactivity with a Specific Epitope of Outer Surface Protein A Predicts Protection from Infection with the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1997: 882-9.

Gray JS. The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Experimental & Applied Acarology* 1998; 22: 249-58.

Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. New York: CABI-Publishing 2002

Guarino C, Asbie S, Rohde J, Glaser A, Wagner B. Vaccination of horses with Lyme vaccines for dogs induces short-lasting antibody responses. *Vaccine* 2017; 35: 4140-7.

Güner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 1649-52.

Guo BP, Norris SJ, Rosenberg LC, Höök M. Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the Proteoglycan Decorin. *Infection and Immunity* 1995; 63: 3467-72.

Hahn CN, Mayhew IG, Whitwell KE, Smith KC, Carey D, Carter SD, Read RA. A possible case of Lyme borreliosis in a horse in the UK. *Equine Veterinary Journal* 1996; 28: 84-8.

Halos L, Bord S, Cotte V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 4413-20.

Halperin JJ (2011) *Lyme Disease: An Evidence-based Approach*, CAB International
Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell H. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 2003; 126: 11-20.

Hansen K, Hindersson P, Pedersen NS. Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 338-46.

Hansen K, Asbrink E. Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* flagellum enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 545-51.

Hansen K, Crone C, Kristoferitsch W. Lyme neuroborreliosis. *Europe PMC* 2013; 115: 559-75.

Hanson MS, Edelman R. Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2: 683-703.

Harter L, Straubinger RK, Summers BA, Erb HN, Appel MJG. Up-regulation of the inducible nitric oxide synthase mRNA in dogs experimentally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 67: 271-84.

Hartmann K, Corvey C, Skerka C, Kirschfink M, Karas M, Brade V, Miller JC, Stevenson B, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P. Functional characterization of BbCRASP-2, a distinct outer membrane protein of *Borrelia burgdorferi* that binds host complement regulators factor H and FHL-1. *Mol Microbiol* 2006; 61: 1220-36.

Hasle G, Bjune GA, Midthjell L, Roed KH, Leinaas HP. Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2: 37-43.

Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation Criteria for Standardized Western Blots for Three European Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1433-44.

Hellwage J, Meri T, Heikkilä T, Alitalo A, Panelius J, Lahdenne P, Seppälä IJT, Meri S. The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 8427-35.

Henderson LM. Overview of marker vaccine and differential diagnostic test technology. *Biologicals* 2005; 33: 203-9.

Holmgren AR, Matteson EL. Lyme Myositis. *Arthritis & Rheumatism* 2006; 54: 2697-700.

Hovius JW, de Wever B, Sohne M, Brouwer MC, Coumou J, Wagemakers A, Oei A, Knol H, Narasimhan S, Hodiamont CJ, Jahfari S, Pals ST, Horlings HM, Fikrig E, Sprong H, Oers MHJ. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet* 2013; 382: 658.

Huppertz HI, Böhme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme Borreliosis in the Würzburg Region of Germany. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1999; 18: 697-703.

James FM, Engiles JB, Beech J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. J Am Vet Med Assoc 2010; 237: 1180-5.

Johnson AL, Divers TJ, Chang YF. Validation of an in-clinic enzyme linked immunosorbent assay kit for diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection in horses. J Vet Diagn Invest 2008; 20: 321-4.

Johnson BJB, Robbins KE, Bailey RE, Cao BL, Sviat SL, Craven RB. Serodiagnosis of Lyme Disease: Accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. J Infect Dis 1996; 174: 346-53.

Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. International Journal of Systemic Bacteriology 1984; 34: 496-7.

Johnson RC. Isolation techniques for spirochetes and their sensitivity to antibiotics in vitro and in vivo. Rev Infect Dis 1989; 11 Suppl. 6: 1505-10.

Kahl O, Janetzki-Mittmann C, Gray JS, Jonas R, Stein J, de Boer R. Risk of Infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a Host in Relation to the Duration of Nymphal *Ixodes ricinus* Feeding and the Method of Tick Removal. Zentralblatt für Bakteriologie 1998; 287: 41-52.

Kalish RA, Leong JM, Steere AC. Association of Treatment-Resistant Chronic Lyme Arthritis with HLA-DR4 and Antibody Reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 1993; 61: 2774-9.

Kamradt T, Lengl-Janssen B, Strauss AF, Bansal G, Steere AC. Dominant recognition of a *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A peptide by T helper cells in patients with treatment-resistant Lyme arthritis. Infect Immun 1996; 64: 1284-9.

Kiss T, Cadar D, Krupaci AF, Bordeanu A, Brudasca GF, Mihalca AD. Serological Reactivity to *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Dogs and Horses from Distinct Areas in Romania. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2011; 11:1259-62.

Kraiczky P, Skerka C, Kirschfink M, Brade V, Zipfel PF. Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *European journal of Immunology* 2001; 31: 1674-84.

Kramer MD, Moter S, Hofmann H, Simon MM, Wallich R (27. Juni 1992) Laboratoriumsdiagnostik bei der *B.-burgdorferi*-Infektion des Menschen („Lyme Borreliose“)

Krupka I, Straubinger RK. Lyme Borreliosis in Dogs and Cats: Background, Diagnosis, Treatment and Prevention of Infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 40 2010: 1103-19.

Krupka I, Bechtel M, Loehnert-Thiel U, Eppendorff R, Straubinger RK. Borreliose: Möglichkeiten und Perspektiven in der Diagnostik. 6. Leipziger Tierärztekongress, AfT-Symposium 21. Januar 2012 2012;

Kurtenbach K, Sewell H, Ogden NH, Randolph SE, Nuttall PA. Serum Complement Sensitivity as a Key Factor in Lyme Disease Ecology. *Infection and Immunity* 1998; 68: 1248-51.

Kurtenbach K, De Michelis S, Etti S, Schafer SM, Sewell H, Brade V. Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato*-the key role of host complement. *Trends Microbiol* 2002; 10: 74-9.

Labandeira-Rey M, Skare JT. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1. *Infect Immun* 2001; 69: 446-55.

Levy SA, Barthold SW, Daubach DM, Wasmoen TL. Canine Lyme borreliosis. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1993; 15: 833-48.

Li X, Liu X, Beck DS, Kantor FS, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* lacking BBK32, a fibronectin-binding protein, retains full pathogenicity. *Infect Immun* 2006; 74: 3305-13.

Liang FT, Philipp MT. Analysis of Antibody Response to Invariable Regions of VlsE, the Variable Surface Antigene of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1999; 67: 6702-6.

Liebisch G. Der Nachweis von Borrelien bei Haus- und Wildtieren: Patienten oder Reservoir der Lyme-Borreliose? 22. Kongress der DVG. Bad Nauheim 1997, 265-270

Ljostad U, Skogvoll E, Eikeland R, Midgard R, Skarpaas T, Berg A, Mygland A. Oral doxycycline versus intravenous ceftriaxone for European Lyme neuroborreliosis: a multicentre, non-inferiority, double-blind randomised trial. *Lancet Neurol* 2008; 7: 690-5.

Luft BJ, Mudri S, Jiang W, Dattwyler RJ, Gorevic PD, Fischer T, Munoz P, Dunn JJ, Schubach WH. The 93-Kilodalton Protein of *Borrelia burgdorferi*: an Immunodominant Protoplasmic Cylinder Antigen. *Infection and Immunity* 1992; 60: 4309-21.

Magnarelli L, Ijdo JW, Van Andel AE. Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the northeastern United States. *J Am Vet Med Assoc* 2000; 217: 1045-50.

Magnarelli L, Fikrig E. Detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in naturally infected horses in the USA by enzyme-linked immunosorbent assay using whole-cell and recombinant antigens. *Res Vet Sci* 2005; 79: 99-103.

Magnarelli LA, Anderson JF. Early detection and persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in persons with Lyme disease. *Infect Dis* 1987; 263: 392-9.

Magnarelli LA, Flavell RA, Padula SJ, Anderson JF, Fikrig E. Serologic Diagnosis of Canine and Equine Borreliosis: Use of Recombinant Antigens in Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 169-73.

Manion TB, Bushmich SL, Khan MI, Dinger J, Werner H, Mittel L, Laurendeau M, Reilly M. Suspected Clinical Lyme Disease in Horses: Serological and Antigen Testing Differences Between Clinically Ill and Clinically Normal Horses from an Endemic Region. *Journal of Equine Veterinary Science* 2001; 21: 229-34.

Manning PG. Fulminant refractory Lyme disease. *Iowa Med* 1989; 79: 277-80.

Maraspin V, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljić E, Jurca T, Picken RN, Strle F. Solitary borrelial lymphocytoma in adult patients. *Europe PMC* 2002; 114: 515-23.

Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Wilske B, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 5410-6.

Margos G, Vollmer S, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1545-63.

Markowicz M, Ladstätter S, Schötta AM, Reiter M, Pomberger G, Stanek G. Oligoarthritis caused by *Borrelia bavariensis*, Austria, 2014. *Emerg. Infect. Dis* 2015; 21: 1052.

Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 295-307.

Masuzawa T, Kurita T, Kawabata H, Yanagihara Y. Relationship between infecivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiology Letters* 1994: 319-24.

Meersschaert C, Cerri S, Houben R, Pitel P-H, De Waele V, Hendrickx G, Amory H. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses in the southern part of Belgium: a „one health“ driven study. AESA congress 2016;

Metcalf KB, Lilley CS, S. RM, Glaser AL, Metcalf ES. The Prevalence of Antibodies against *Borrelia burgdorferi* Found in Horses Residing in the Northwestern United States. *Journal of Equine Veterinary Science* 2008; 28: 587-9.

Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, Mc Call S, Yu S, Mc Geer PL. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation* 2008; 5.

Miller JC, El-Hage N, Babb K, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* B31 Erp Proteins That Are Dominant Immunoblot Antigens of Animals Infected with Isolate B31 Are Recognized by Only a Subset of Human Lyme Disease Patient Sera. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1569-74.

Montgomery RR, Malawista SE, Feen KJM, Bockenstedt LK. Direct Demonstration of Antigenetic Substitution of *Borrelia burgdorferi* Ex Vivo: Exploration of the Paradox of the Early Immune Response to Outer Surface Proteins A and C in Lyme Disease. *Journal of Experimental Medicine* 1996; 183: 261-9.

Motaleb MA, Corum L, Bono JL, Abdallah FE, Rosa PA, Samuels DS, Charon NW. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and mobility functions. Department of Microbiology and Immunology 2000; 97: 10899-904.

Müllegger RR, Glatz M. Skin Manifestations of Lyme Borreliosis. American Journal of Clinical Dermatology 2008; 9: 355-68.

Müller I, Khanakah G, Kundi M, Stanek G. Horses and *Borrelia*: Immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding school in Vienna. International Journal of Medical Microbiology 2002; 33: 80-7.

Munk PS, Orn S, Larsen AI. Lyme carditis: persistent local delayed enhancement by cardiac magnetic resonance imaging. Int J Cardiol 2007; 115: e108-10.

Nowling JM, Philipp MT. Killing of *Borrelia burgdorferi* by antibody elicited by OspA vaccine is inefficient in the absence of complement. Infect Immun 1999; 67: 443-5.

O' Connor TP, Esty KJ, Hanscom JL, Shields P, Philipp MT. Dogs vaccinated with common Lyme disease vaccines do not respond to IR6, the conserved immunodominant region of the VlsE surface protein of *Borrelia burgdorferi*. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 458-62.

Ojaimi C, Brooks CS, Casjens S, Rosa PA, Elias A, Barbour AG, Jasinskas A, Benach JL, Katona L, Radolf JD, Caimano MJ, Skare JT, Swingle K, Akins DR, Schwartz I. Profiling of Temperature-Induced Changes in *Borrelia burgdorferi* Gene Expression by Using Whole Genome Arrays. Infection and Immunity 2003; 71: 1689-705.

Pal U, Yang X, Chen M, Bockenstedt LK, Anderson JF, Flavell RA, Norgard MV, Fikrig E. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of Ixodes scapularis salivary glands. J Clin Invest 2004a; 113: 220-30.

Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, Desilva AM, al. e. TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for *Borrelia burgdorferi*. Cell 2004b; 119: 457-68.

Pal U, Wang G, Bao F, Yang X, Samanta S, Schoen RT, Wormser GP, Schwartz I, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* basic membrane proteins A and B participate in the genesis of Lyme arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 2008; 205: 133-41.

Passamonti F, Veronesi F, Cappelli K, Capomaccio S, Reginato A, Miglio A, Vardi DM, Stefanetti V, Coletti M, Bazzica C, Pepe M. Polysynovitis in a horse due to *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection--Case study. *Ann Agric Environ Med* 2015; 22: 247-50.

Peavey CA, Lane RS. Transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes Pacificus* Nymphs and Reservoir Competence of Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) Infected by Tick-Bite. *The Journal of Parasitology* 1995; 81: 175-8.

Piesman J, Schneider BS, Zeidner N. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4145-8.

Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology* 2004; 129: 191-220.

Pollack RJ, Tlford III SR, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Invest* 1993; 31: 1251-5.

Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene* 1986; 263: 112-8.

Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 1989; 17

Purser JE, Norris SJ. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *PNAS* 2000; 97: 13865-70.

Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang X, Fish D. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect mammalian host. *NATURE* 2005; 436: 573-7.

Randolph SE. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2011; 2: 179-82.

Rauter C, Hartung T. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 7203-16.

Reiber H, Ressel CB, Spreer A. Diagnosis of neuroborreliosis – Improved knowledge base for qualified antibody analysis and cerebrospinal fluid data pattern related interpretations. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 2013; 19: 159-69.

Riond JL, Riviere JE, Duckett WM, Atkins CE, Jernigan AD, Rikihisa Y, Spurlock SL. Cardiovascular effects and fatalities associated with intravenous administration of doxycycline to horses and ponies. *Equine Vet J* 1992; 24: 41-5.

Robert-Koch-Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte. Lyme-Borreliose:
http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpiBull/Merkblaetter/Ratgeber_LymeBorreliose.html; 2013

Rosa PA, Schwan TG. A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1989; 160: 1018-29.

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2: 123-8.

Russell H, Sampson JS, Schmid GP, Wilkinson HW, Plikaytis B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Indirect Immunofluorescence Assay for Lyme Disease. *J Infect Dis* 1984; 149: 465-70.

Ruzić-Sabljić, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Jurca T, Logar M, Pikelji-Pecnik A, et al. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wiener Klinische Wochenschrift* 2002; 114: 544-50.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY. 1989.

Sapi E, Bastian SL, Mpoy CM, Scott S, Rattelle A, Pabbati N, Poruri A, Burugu D, Theophilus PA, Pham TV, Datar A, Dhaliwal NK, MacDonald A, Rossi MJ, Sinha SK, Luecke DF. Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. PLoS One 2012; 7: e48277.

Schaible UE, Kramer MD, Eichmann K, Modolell M, Musetaenu C, Simon MM. Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 8: 3768-72.

Schönert S, Grabner A, Heidrich J, Schönberg A, Nöckler K, Bahn P, Luge E, Brem S, Müller W. Lyme-Borreliose beim Pferd? – Vergleichende Betrachtungen zum direkten und indirekten Erregernachweis. Prakt. Tierarzt 2002; 83 (12): 1064-1068.

Scholz HC, Margos G, Derschum H, Speck S, Tserennorov D, Erdenebat N, Undraa B, Enkhtuja M, Battseteg J, Otgonchimeg C, Otgonsuren G, Nymadulamb B, Römer A, Thomas A, Essbauer S, Wölfel R, Kiefer D, Zöller L, Otgonbaatar D, Fingerle V. High prevalence of genetically diverse *Borrelia bavariensis*-like strains in *Ixodes persulcatus* from Selenge Aimag, Mongolia. Ticks and Tick-borne Diseases 2013; 4: 89-92.

Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson BJB, Wilske B. Significant Improvement of the Recombinant *Borrelia*-Specific Immunoglobulin G Immunoblot Test by Addition of VlsE and a DbpA Homologue Derived from *Borrelia garinii* for Diagnosis of Early Neuroborreliosis. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41: 1299-303.

Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC. Induction of an Outer Surface Protein on *Borrelia burgdorferi* During Tick Feeding. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 2909-13.

Schwan TG, Piesman J. Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. J Clin Microbiol 2000; 38: 382-8.

Scoles GA, Papero M, Beati L, Fish D. A Relapsing Fever Group Spirochete Transmitted by *Ixodes scapularis* Ticks. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 2001; 1: 21-34.

Sears KP, Divers T, Neff RT, Miller WH, Mc Donough SP. A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Veterinary Dermatology* 2012; 23: 153-6.

Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P (2011) *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. ENKE-Verlag

Shin JJ, Bryksin AV, Godfrey HP, Cabello FC. Localization of BmpA on the Exposed Outer Membrane of *Borrelia burgdorferi* by Monospecific Anti-Recombinant BmpA Rabbit Antibodies. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2280-7.

Shin JS, Chang YF, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale T, Appel MJG, Lein DH. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet Microbiol* 1993; 36: 161-74.

Sigal LH. Early Disseminated Lyme Disease: Cardiac Manifestations. *The American Journal of Medicine* 1995; 98: 4A-29S.

Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Krunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. *N Engl J Med* 1998; 339: 216-22.

Simpson WJ, Schrupf ME, Schwan TG. Reactivity of Human Lyme Borreliosis Sera with a 39-Kilodalton Antigen Specific to *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1329-37.

Simpson WJ, Schrupf ME, Hayes SF, Schwan TG. Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1940-8.

Skuballa J, Petney T, Pfaffle M, Oehme R, Hartelt K, Fingerle V, Kimmig P, Taraschewski H. Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus spp.*) in Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 2012; 3: 8-13.

Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, Sikand V, Nowakowski J, Parenti DL, Holman MS, Persing DH, Steere AC. Clinical Characteristics and Treatment Outcome of Early Lyme Disease in Patients with Microbiologically Confirmed Erythema Migrans. *Ann Intern Med* 2002; 136: 421-8.

Stanek G, Strle F. Lyme Disease - European Perspective. *ScienceDirect Journals* 2008; 22: 327-39.

Stanek G. Pandora's Box: pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Central Europe. *Wien Klin Wochenschr* 2009; 121: 673-83.

Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE. The Early Clinical Manifestations of Lyme Disease. *Ann Intern Med* 1983; 99: 76-82.

Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The Clinical Evolution of Lyme Arthritis. *Annals of Internal Medicine* 1987; 107: 725-31.

Steere AC, Sikand V, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 209-15.

Steere AC. Lyme Disease. *N Engl J Med* 2001; 345: 115-25.

Steere AC, Dhar A, Hernandez J, Fischer PA, Sikand V, Schoen RT, Nowakowski J, McHugh G, Persing DH. Systemic Symptoms without Erythema Migrans as the Presenting Picture of Early Lyme Disease. *The American Journal of Medicine* 2003; 114: 58-62.

Straubinger RK, Summers BA, Chang YF, Appel MJG. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* 1997a; 35: 111-6.

Straubinger RK, Straubinger AF, Härter L, Jacobson RH, Chang Y-F, Summers BA, Erb HN, Appel MJG. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-

regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infect Immun* 1997b; 65: 1273-85.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summer BA, Erb HN, Härter L, Appel MJG. Clinical manifestations, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien Klin Wochenschr* 1998a; 110: 874-81.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summer BA, Erb HN, Härter L, Appel MJG. *Borrelia burgdorferi* Induces the Production and Release of Proinflammatory Cytokines in Canine Synovial Explant Cultures. *Infection and Immunity* 1998b; 66: 247-58.

Straubinger RK. PCR-Based Quantification of *Borrelia burgdorferi* Organisms in Canine Tissues over a 500-Day Postinfection Period. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2191-9.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH. Status of *Borrelia burgdorferi* infection after antibiotic treatment and the effects of corticosteroids: An experimental study. *J Infect Dis* 2000; 181: 1069-81.

Straubinger RK, Dharma RT, Davidson E, Summers BA, Jacobson RH, Frey AB. Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. *Vaccine* 2001; 20: 181-93.

Straubinger RK (2017) Nicht jede unerklärbare Lahmheit ist eine Borreliose. Enke Verlag, Pferdespiegel; 15-7.

Strle F. Comparison of Culture-Confirmed Erythema Migrans Caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med* 1999; 130: 32-6.

Stupica D, Lusa L, Ruzic-Sabljić E, Cerar T, Strle F. Treatment of erythema migrans with doxycycline for 10 days versus 15 days. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 343-50.

Takano A, Kolchi G, Une U, Shimada Y, Fuljta H, Shiino T, Watanabe H, Kawabata H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environmental Microbiology* 2010; 12: 131-46.

Targelová V, Koci J, Hannincová K, Kurtenbach K, Derdáková M, Ogden NH, Literák I, Kocianová E, Labuda M. Blackbirds and Song Thrushes Constitute a Key Reservoir of *Borrelia garinii*, the Causative Agent of Borreliosis in Central Europe. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74: 1289-93.

Thomas V, Anguita J, Samanta S, Rosa PA, Stewart P, Barthold SW, Fikrig E. Dissociation of infectivity and pathogenicity in *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun 2001; 69: 3507-9.

Thompson A, Mannix R, Bachur R. Acute Pediatric Monoarticular Arthritis: Distinguishing Lyme Arthritis From Other Etiologies Pediatrics 2009; 123

Töpfer K (2007) Charakterisierung der humoralen Immunantwort im Hund nach Impfung mit verschiedenen Impfstoffen gegen den Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia burgdorferi*, unter Berücksichtigung zweier verschiedener Impfstrategien. Inaugural Dissertation der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Tsang V, Wilson BC, Maddison SE. Kinetic studies of a quantitative single-tube enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Chem 1980; 26: 1255-60.

Ullmann AJ, Lane RS, Kurtenbach K, Miller M, Schriefer ME, Zeidner N, Piesman J. Bacteriolytic Activity of Selected Vertebrate Sera for *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto and *Borrelia bissettii*. Journal of Parasitology 2003; 89: 1256-7.

Van Hoecke C, Lebaqc E, Beran J, Parenti DL. Alternative Vaccination Schedules (0, 1, and 6 Months versus 0,1, and 12 Months) for a Recombinant OspA Lyme Disease Vaccine. Clinical Infectious Diseases 1999; 28: 1260-4.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Garcia-Tapia D, Erb HN, Earnhart C, Marconi R, Meeus P. Antibodies to *Borrelia burgdorferi* OspA, OspC, OspF, and C6 antigens as markers for early and late infection in dogs. Clin Vaccine Immunol 2012; 19: 527-35.

White G, Prior SD. Comparative effects of oral administration of trimethoprim/sulphadiazine or oxytetracycline on the faecal flora of horses. Vet Rec 1982; 111: 316-8.

Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Busch KV. Immunochemical and immunological analysis of European *Borrelia burgdorferi* strains. Zentralblatt für Bakteriologie 1986; 263: 92-102.

Wilske B, Zöller L, Brade V, Eiffert H, Goebel UB, Stanek G, Pfister HW. MiQ 12,20 Lyme Borreliose. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer, Munich, Germany 2001: 23-5.

Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 49: 13-21.

Wormser GP. Early Lyme Disease. N Engl J Med 2006; 354: 2794-801.

Wright D, Thompson MA, Miller MJ, Knerl KM, Elms SL, Karpowicz JC, Young JF, Kramer VL. Ecology of *Borrelia burgdorferi* in Ticks (Acari: Ixodidae), Rodents, and Birds in the Sierra Nevada Foothills, Placer County, California. Journal of Medical Entomology 2000; 37: 906-18.

Wright D. Borrel's accidental legacy. Department of Microbiology and Immunology 2009; 15: 397-9.

Xu G, Fang QQ, Keirans JE, Durden LA. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. Journal of Parasitology 2003; 89: 452-7.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenetic Variation in Lyme Disease Borreliae by Promiscuous Recombination of VMP-like Sequence Cassettes. Cell 1997; 89: 275-85.

Zhang JR, Norris SJ. Kinetics and In Vivo Induction of Genetic Variation of VlsE in *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 1998; 66: 3689-97.

Zhong W, Stehle T, Musetaenu C, Siebers A, Gern L, Kramer M, Wallich R, Simon MM. Therapeutic passive vaccination against chronic Lyme disease in mice. Proc Nat Acad Sci the U.S.A 1997; 94: 12533-8.

Zoeller L, Cremer J, Faulde M. Western Blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. Electrophoresis 1993; 14: 937-44.

Danksagung

Ich möchte die Gelegenheit nutzen und mich bei einigen Menschen besonders herzlichen Bedanken.

Mein größtes Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. Straubinger, der mir während der Zeit der Blutprobenentnahmen und Impfungen als auch beim Schreibprozess dieser Arbeit zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist. Ohne ihn wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen. Ein besonderer Dank gilt ferner Prof. Dr. Kraiczy und seinem Team am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in Frankfurt für die Bereitstellung der rekombinanten OspA-Antigene.

Weiterhin möchte ich mich recht herzlich bei der Hanns-Seidel-Stiftung e.V. sowohl für die finanzielle als auch für die ideelle Förderung über einen Zeitraum von zwei Jahren bedanken. Im Zusammenhang mit den regelmäßigen Stipendiatentreffen und den Seminaren in Kloster Banz konnte ich nicht nur lehrreiche Kontakte, sondern auch Freundschaften knüpfen.

Ein großes Dankeschön gilt weiterhin Herrn Dr. med. vet. Helmut Feigl und dem gesamten Team der Pferdefahrpraxis in Anham. Ohne ihre Mithilfe wäre es unmöglich gewesen, eine Vielzahl von Pferdebesitzern zu gewinnen, die mir ihre Pferde zur Immunisierung sowie auch zur Blutentnahme bereitgestellt haben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich natürlich auch bei den Pferdebesitzern für das entgegengebrachte Vertrauen und Engagement bedanken.

Ich danke weiterhin den Mitarbeitern des Instituts für Infektionsmedizin und Zoonosen der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München. Ohne die besonderen Bemühungen von Elisabeth Aschinger-Kirch und Stephanie Hiereth wäre ich schon sehr früh an meine Grenzen gestoßen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Großvater und meiner Tante bedanken, die mich beständig motiviert und meine Launen ertragen haben. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Sebastian bedanken, der immer für mich da war und mich in jeglicher Hinsicht tatkräftig unterstützt hat.