

**Charakterisierung der humoralen Immunantwort von
Hunden nach Impfung gegen die Lyme-Borreliose anhand
zwei verschiedener Impfstrategien**

von Claudia Katharina Wilczek

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

**Charakterisierung der humoralen Immunantwort von
Hunden nach Impfung gegen die Lyme-Borreliose anhand
zwei verschiedener Impfstrategien**

von Claudia Katharina Wilczek

aus Amberg

München 2023

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: Priv.-Doz. Dr. Michèle M.-J. D. Bergmann

Tag der Promotion: 22.07.2023

Für C., meine beste Freundin

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT.....	3
1	Lyme-Borreliose: Erreger, Vektor und Einfluss des Klimas	3
1.1	Beschreibung und mikrobiologische Zugehörigkeit der Erreger	3
1.2	Vektoren des <i>Bbsl</i> -Komplexes	5
1.3	Einfluss des Klimas	7
2	Lyme-Borreliose: Krankheitsgeschehen	9
2.1	Infektionsmechanismus	9
2.2	Immunreaktion nach Infektion mit <i>Borrelia burgdorferi</i>	13
2.3	Krankheitsbild der Lyme-Borreliose beim Hund.....	15
2.4	Krankheitsbild der Lyme-Borreliose beim Menschen	17
2.4.1	Frühes, lokales Krankheitsstadium beim Menschen	18
2.4.2	Frühes, disseminiertes Krankheitsstadium beim Menschen	19
2.4.3	Spätes Krankheitsstadium der Lyme-Borreliose beim Menschen	20
2.5	Diagnose der Lyme-Borreliose	21
2.5.1	KELA (ELISA)	23
2.5.2	LIA (Immunoblot).....	24
2.5.3	SNAP® 4Dx Plus (ELISA)	25
2.6	Therapie der Lyme-Borreliose	26
3	Präventivmaßnahmen gegen die Lyme-Borreliose	28
3.1	Manuelle Entfernung von Zecken	29
3.2	Repellentien und Ektoparasitika.....	30
3.2.1	Topische Formulierung von Antiparasitika.....	30
3.2.2	Orale Formulierung von Antiparasitika	32
3.3	Immunisierung durch Impfung gegen die Lyme-Borreliose.....	33
3.3.1	Immunmechanismus der Impfung.....	33
3.3.2	Impfstoffe	35
III.	PUBLIKATION	38
IV.	DISKUSSION	52
	Notwendigkeit der Impfung	52

	Einstufung als <i>Non-Core</i>-Vakzine.....	56
	Impfstoffe und Impfschemata gegen die Lyme-Borreliose	59
V.	ZUSAMMENFASSUNG	62
VI.	SUMMARY.....	64
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	66
VIII.	ANHANG	96
IX.	DANKSAGUNG	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACA	<i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i>
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
<i>Bbsl</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu latu
<i>Bbss</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
DNA	deoxyribonucleic acid (dt.Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	<i>Erythema migrans</i>
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
KELA	Kinetic-ELISA
LB	Lyme-Borreliose
LIA	Line-Immunoassay
Osp	Outer surface protein
p	Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNS	Peripheres Nervensystem
Salp	Salivary protein
VlsE	Variable major protein-like sequence, expressed
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zweijähriger Wirtszyklus von <i>I. ricinus</i>	6
Abbildung 2: Verbreitung von <i>I. ricinus</i> und <i>I. persulcatus</i> in Europa im Jahr 2022 (KAHL & GRAY, 2023).....	8
Abbildung 3: Aufnahme von <i>B. burgdorferi</i> aus einem infizierten Wirt in die Zecke (KUROKAWA <i>et al.</i> , 2020).....	10
Abbildung 4: Übertragung von <i>B. burgdorferi</i> aus der Zecke in einen Wirbeltier- Wirt (KUROKAWA <i>et al.</i> , 2020)	12
Abbildung 5: Ausprägung eines EM zu einem frühen Zeitpunkt (a) und nach acht Tagen (b) (TREVISAN <i>et al.</i> , 2022).....	18
Abbildung 6: Farbumschlag auf einer Mikrotiterplatte nach durchgeführtem KELA	23
Abbildung 7: Antikörperverlauf der Studiengruppen <i>V-basic</i> und <i>V-plus</i> während des Beobachtungszeitraums, dargestellt mit Borrelia Veterinär plus OspA LINE (WILCZEK <i>et al.</i> , 2022).....	24
Abbildung 8: Karte der gemeldeten Fälle humaner LB in den Bundesländern mit LB-Meldepflicht in Deutschland der Jahre 2017-2021 (TIMCKE <i>et al.</i> , 2022).....	58

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG

Abbildung A 1: Nutzungsrecht für Abbildung 3.....	97
Abbildung A 2: Nutzungsrecht für Abbildung 4.....	99

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Manifestationen der LB in Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium beim Menschen, modifiziert nach Robert Koch-Institut (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019)	17
Tabelle 2: Einteilung der Neuroborreliose nach Dauer und Symptomen, modifiziert nach Mygland <i>et al.</i> (MYGLAND <i>et al.</i> , 2010).	19
Tabelle 3: Übersicht über die im Jahr 2022 zugelassenen Impfstoffe in Deutschland, modifiziert nach Paul-Ehrlich-Institut (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2022).....	35

I. EINLEITUNG

Die Lyme-Borreliose (LB) gilt als die häufigste, von Zecken übertragene Krankheit der nördlichen Hemisphäre (WU *et al.*, 2011). Bei den Erregern dieser Erkrankung handelt es sich um Bakterien des *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl*)-Komplexes, benannt nach Willy Burgdorfer, welcher sie im Jahr 1982 zum ersten Mal beschrieben hat (BURGDORFER *et al.*, 1982). LB ist eine multisystemische Erkrankung, an welcher nicht nur Menschen, sondern auch Tiere erkranken können. Während in der Humanmedizin das *Erythema migrans* (EM), eine spezifische Hautläsion, als häufigste und frühe Veränderung bekannt ist (STEERE, 1989), sind die klinischen Anzeichen bei Hunden weitaus unspezifischer, sodass kein einheitliches Krankheitsbild beschrieben werden kann. Klinische Manifestationen bei Hunden schließen Lahmheiten, erhöhte Körpertemperatur, Arthritis oder Gelenkschwellung ein (STRAUBINGER *et al.*, 1997a). Aber auch kardiologische Auswirkungen, Nephritis, neurologische Störungen oder Myositis werden in der Literatur aufgeführt (RAYA *et al.*, 2010; INOKUMA *et al.*, 2013; ADASZEK *et al.*, 2020; PREYß-JÄGELER *et al.*, 2022). Die Verteilung der Erregerspezies unterliegt einer hohen geographischen Diversität. Für den europäischen Kontinent zählen *B. garinii*, *B. afzelii* sowie *Bbss* zu den wichtigsten Erregern der LB (BRANDA & STEERE, 2021). Nicht nur die Erreger unterscheiden sich zwischen den Kontinenten, sondern auch die Vektoren. In Europa gilt der Gemeine Holzbock (*I. ricinus*), ein Vertreter der Schildzecken, als hauptverantwortlicher Vektor (GRAY *et al.*, 2021). Dieser infiziert sich durch den Saugakt an Wildtieren, wie zum Beispiel Waldsäugetieren und Vögeln (GERN *et al.*, 1998), welche als Reservoir dienen. Die Aktivität von Zecken ist temperaturabhängig und konnte somit bisher als bimodal saisonal betrachtet werden (MACLEOD, 1936). Aufgrund des Klimawandels und dem damit einhergehenden Temperaturanstieg muss von einer Zunahme der Aktivität als auch der Reproduktion von Zecken ausgegangen werden (DAUTEL *et al.*, 2008). Durch diese Entwicklung steigt das Risiko für Mensch und Tier, von Zecken befallen und mit Erregern der LB infiziert zu werden und zu erkranken, was den Präventivmaßnahmen einen noch höheren Stellenwert verleiht. Während es für den Menschen im Moment keine Möglichkeit einer Impfung gegen die LB gibt, existieren für Hunde mehrere zugelassene Impfstoffe in Deutschland. Nicht nur deren jährliche Wiederholung, sondern auch das richtige Impfschema sind unerlässlich, um die Schutzwirkung der Impfung in Anbetracht des steigenden Infektionsrisikos zu optimieren und

ganzjährig zu erhalten. Das Ziel dieser retrospektiven Studie war es, die Antikörperspiegel von Hunden nach der Immunisierung durch Impfung im zeitlichen Verlauf eines Jahres dazustellen. Durch die Anwendung zweier unterschiedlicher Impfschemata sollte außerdem der Effekt einer zusätzlichen, sogenannten Booster-Impfung auf die Höhe und den Erhalt der gebildeten Antikörper und den damit verbundenen Schutz der Tiere veranschaulicht werden. Der verwendete Impfstoff, Merilym 3 (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland), ist in Deutschland der einzig zugelassene Impfstoff, welcher Schutz vor Infektion mit drei in Europa vorherrschenden und für die LB verantwortlichen Erregerspezies bietet: *B. garinii*, *B. afzelii* sowie *Bbss*.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Lyme-Borreliose: Erreger, Vektor und Einfluss des Klimas

1.1 Beschreibung und mikrobiologische Zugehörigkeit der Erreger

Im Jahr 1982 beschrieb Willy Burgdorfer spiralförmige Bakterien mit einer Länge von 3-20 µm sowie einem Durchmesser von 0,2-0,5 µm (BURGDORFER *et al.*, 1982). Benannt wurde diese Spezies nach dem französischen Mediziner Amédée Borrel (WRIGHT, 2009). Die Gattung der *Borrelia* wird der Familie der Borreliaceae zugeordnet, welche zum Stamm der Spirochaetota gehört (PARTE *et al.*, 2020). Eine Besonderheit der Spirochäten stellt die Tatsache dar, dass sie sowohl über ihre ribosomale RNA Sequenz, als auch durch ihre Morphologie identifiziert werden können (WOESE, 1987). Sie besitzen Axialfilamente, welche als Endoflagellen dienen und deren Kontraktilität für den spiralartigen Charakter sowie die Motilität der Bakterien verantwortlich ist (GRAY *et al.*, 2002). Innerhalb der Gattung *Borrelia* findet sich eine Vielzahl verschiedener Spezies wieder, von denen bislang drei Hauptgruppen eine besondere Bedeutung zugeschrieben wird: die Reptilien-assoziierten Borrelien (TAKANO *et al.*, 2010), die Rückfallfieber Borrelien sowie die Borrelien des Bbsl-Komplexes (CUTLER *et al.*, 2017). Dieser Gruppe werden gegenwärtig über 20 Genospezies zugeordnet, darunter auch die Erreger der LB (WOLCOTT *et al.*, 2021). Zwar gilt die LB sowohl in Europa als auch in Nordamerika als eine der häufigsten Infektionskrankheiten, dennoch weisen die zu Grunde liegenden bakteriellen Erreger einige Unterschiede bezüglich ihres geographischen Vorkommens, ihrer Vektoren, ihrer Wirtsspezifität, ihres Gewebstropismus sowie ihrer Pathogenität auf (KUROKAWA *et al.*, 2020). In Nordamerika wird die LB durch die Genospezies *Bbss* verursacht (WORMSER *et al.*, 2008; STANEK *et al.*, 2012). In Europa sind die hauptverantwortlichen Krankheitsverursacher *B. afzelii*, *B. garinii*, *Bbss*, *B. bavariensis* sowie *B. spielmanii* (STANEK *et al.*, 2011; STRNAD *et al.*, 2017). Je nach geographischer Lokalisation werden diese verschiedenen Borrelien-Spezies durch unterschiedliche Spezies der Familie Ixodidae übertragen. Während in Nordamerika *I. scapularis* und *I. pacificus* als Vektoren fungieren (DENNIS *et al.*, 1998; PIESMAN & GERN, 2004), findet die Übertragung in Europa hauptsächlich über *I. ricinus* statt (GRAY, 1998). Die einzelnen Borrelien-Spezies besitzen eine unterschiedliche Spezifität und damit ein breites

Spektrum hinsichtlich ihrer Wirtsorganismen (KURTENBACH *et al.*, 2002). Während *B. afzelii* vor allem auf Kleinsäuger wie Nagetiere als Reservoirwirt angewiesen ist, wird *B. garinii* durch Vögel auf Zecken übertragen (GERN *et al.*, 1998; HANINCOVÁ *et al.*, 2003; TARAGEL'OVÁ *et al.*, 2008). *Bbss* hingegen konnte aus beiden dieser Reservoirwirte isoliert werden (TUFTS *et al.*, 2019). Diese Anpassungsfähigkeit von *Bbsl* an verschiedene Wirtsorganismen stellt einen wesentlichen Faktor für deren geographische Verteilung, sowie ihre Populationsstruktur dar (VAN DAM, 2002; MARGOS *et al.*, 2009). Möglich wird diese Adaption an unterschiedliche Wirte durch eine sich zwischen den Genospezies unterscheidende Interaktion mit dem Komplementsystem ihrer Wirte (KRAICZY *et al.*, 2001). Das Komplementsystem spielt eine bedeutende Rolle bei der körpereigenen Abwehr von Pathogenen und führt über die ausgelöste Kaskade im besten Fall zu deren Elimination (MERLE *et al.*, 2015).

1.2 Vektoren des *Bbsl*-Komplexes

Die LB gilt als die häufigste, von Zecken übertragene Erkrankung der nördlichen Hemisphäre (WU *et al.*, 2011). In Europa zählt *I. ricinus*, der Gemeine Holzbock, zu den hauptverantwortlichen Vektoren, aber auch *I. persulcatus* ist ein bedeutender Vektor für Teile Eurasiens (Skandinavien) (GRAY, 1998; VASSALLO *et al.*, 2000; LAAKSONEN *et al.*, 2017). Auf dem nordamerikanischen Kontinent sind *I. scapularis* sowie *I. pacificus* vorherrschend für die Übertragung verantwortlich (PIESMAN & GERN, 2004). *I. ricinus* ist in nahezu ganz Europa aufzufinden und wurde sogar in Nordafrika beschrieben (BOUATTOUR *et al.*, 2004), was seine Anpassungsfähigkeit an verschiedene geographische Gegebenheiten unterstreicht. Als Vertreter der Schildzecken zeichnet sich sein mehrjähriger Lebenszyklus durch unterschiedliche Stufen, dargestellt in Abbildung 1, aus: Ei, Larve, Nymphe, Adulte (MARQUES, 2010). In jedem dieser Stadien ist eine Blutmahlzeit unabdingbar, um die Entwicklung zum nächsten Lebensabschnitt abzuschließen. Dabei können Pathogene von infizierten Reservoirtieren aufgenommen werden (STANEK, 2009). Während Larven in niedrigen Vegetationsschichten bis zu 20 cm Höhe leben und an Kleinsäugetern, Reptilien und Vögeln saugen, kann man Nymphen auch in höheren Vegetationsschichten bis zu 40 cm finden. Zu ihren bevorzugten Wirten zählen kleine und mittelgroße Säugetiere, teils auch Weidevieh, Wild und Menschen. Nach der Blutmahlzeit kommt es zu einer erneuten Häutung und Entwicklung zur adulten Zecke. Weibliche Tiere benötigen zur Komplettierung des Reproduktionszyklus eine dritte Blutmahlzeit, meist auf größeren Säugetieren wie Wildwiederkäuern. Nachdem der Paarungsakt mit männlichen Zecken auf dem Wirtsorganismus erfolgt ist, legt eine weibliche Zecke ca. 2.000-3.000 Eier im Boden ab, aus welchen sich nach bis zu zwei Monaten Larven entwickeln (PIESMAN & GERN, 2004; FRANKE *et al.*, 2008; STANEK, 2009). *I. ricinus* zeigt eine nur geringe Wirtsspezifität und befällt sowohl Säugetiere unterschiedlicher Größe als auch Vögel und Reptilien. Insgesamt wurden bereits mehr als 300 verschiedene Wirte beschrieben (ANDERSON, 1991). Da männliche, adulte Tiere nur geringe Mengen Blut ihrer Wirtstiere aufnehmen, wird ihrer Rolle als krankheitsübertragende Vektoren keine große Bedeutung zugesagt (PIESMAN & GERN, 2004). Die Umgebungstemperatur und die Luftfeuchtigkeit stellen zwei essenzielle Voraussetzungen für die Entwicklung, Reproduktion sowie die Aktivität der Zecken dar (LINDGREN *et al.*,

2000; GRAY *et al.*, 2009; SIROTKIN & KORENBERG, 2018). Es wird angenommen, dass die Stoffwechselrate während zu niedriger Temperaturen nicht ausreichend hoch ist, damit die Zecken aktiv auf Wirtssuche gehen können (CLARK, 1995). Um während der sogenannten *Off-Host*-Phase, in der sich die Zecke zu keiner Blutmahlzeit an einem Wirt befindet und welche bis zu 90 % ihres Lebenszyklus einnehmen kann (NEEDHAM & TEEL, 1991; RANDOLPH, 2004), zu überleben, ist *I. ricinus* auf eine relative Luftfeuchtigkeit von mindestens 80 % angewiesen. Ist diese Rate gegeben, können sie aktiv Wasser aus ihrer Umwelt bzw. aus der Luft aufnehmen. Ist die Luftfeuchtigkeit jedoch geringer, wird eigenes Körperwasser verbraucht (KAHL & KNÜLLE, 1988). Diese Gegebenheiten finden sich vor allem in Laub- und Nadelwäldern, Weide- und Moorlandschaften aber auch in Laubschichten nahe der Erde sowie städtischen Parks (MEDLOCK *et al.*, 2013). Zur Wirtssuche erklimmt *I. ricinus* aktiv Teile der umgebenden Vegetation bis hin zu einem Meter Höhe und reagiert vor allem auf unspezifische Stimuli wie Veränderungen des Kohlenstoffdioxidgehalts, Vibrationen, plötzlich auftretende Schatten sowie Temperaturerhöhungen (GRAY *et al.*, 2021; NOLZEN *et al.*, 2022). Ist die Wirtssuche von *I. ricinus* erfolgreich und es kommt zu einer Blutmahlzeit, besteht für den Wirt das Risiko der Übertragung pathogener Erreger wie *Bbsl*, aber auch *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. sowie dem Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (KLAUS *et al.*, 2010; MEDLOCK *et al.*, 2013; CUNZE *et al.*, 2022; WEBER, 2022).

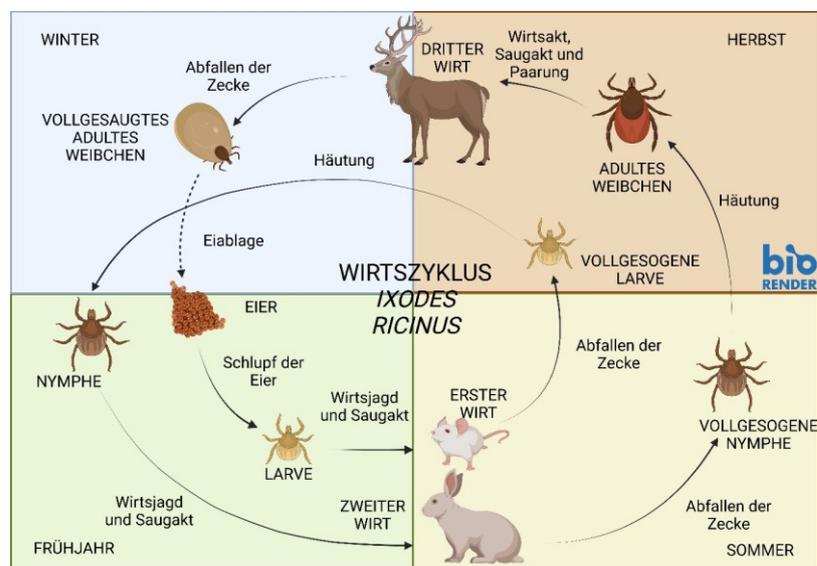


Abbildung 1: Zweijähriger Wirtszyklus von *I. ricinus*.

Der innere Kreis beschreibt das erste Lebensjahr, während der äußere Kreis das zweite Lebensjahr darstellt.

1.3 Einfluss des Klimas

Die Aktivität von Zecken unterliegt den äußeren Einflüssen wie Temperatur, Niederschlag und relativer Luftfeuchtigkeit (NOLZEN *et al.*, 2022). Larven zeigen ihre Aktivitätsspitzen von Mai bis Juni sowie August bis Oktober, während Nymphen von April bis Mai sowie September bis Oktober am aktivsten sind. Die Aktivitätspeaks der adulten Stadien von *I. ricinus* zeigen sich von Mai bis Juni und in einer zweiten Welle von September bis Oktober (GRAY, 1991). Diese bimodale saisonale Aktivität ist die biologische Strategie von Zecken, die für sie ungünstigen Vegetationsperioden zur Wirtssuche zu vermeiden. Der Hochsommer mit heißen Temperaturen und einer geringen Luftfeuchtigkeit sowie niedrige Temperaturen im Winter werden dabei vermieden und sichern *I.-ricinus*-Zecken das Überleben (GRAY *et al.*, 2016). Doch auch Zecken sind adaptionsfähig. Der Klimawandel, welcher zu milderen Wintern und verlängerten Frühjahr- und Herbstperioden führt, bedingt eine zunehmend ganzjährige Aktivität der Zecken und die Möglichkeit zur Verbreitung in nördlichere Breitengrade, sowie in größere Höhenlagen, welche sie zuvor aufgrund ungünstiger klimatischer Bedingungen nicht besiedeln konnten (GRAY *et al.*, 2009; MEDLOCK *et al.*, 2013). In Schweden konnte in einer Studie von 2009 gezeigt werden, dass Zecken in Regionen im Norden des Landes gefunden wurden, wo sie in den frühen 1990er Jahren noch nicht beschrieben wurden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Zeckenpopulation in Regionen in Süd- und Zentralschweden beobachtet, in welchen LB endemisch auftritt (JAENSON *et al.*, 2012). Zwischen 1976 und 2016 wurde auch in Island ein Anstieg des Zeckenaufkommens verzeichnet, wobei Hunde die häufigsten Wirte waren (ALFREDSSON *et al.*, 2017). In östlichen Teilen Sibiriens hat eine Studie signifikante Zusammenhänge zwischen der jährlichen Durchschnittstemperatur sowie der Hydrothermik mit der Dokumentation von Zeckenstichen dargelegt (VLADIMIROV *et al.*, 2021). Sogar in Deutschland, wo die eigentliche Zeckensaison bislang von März oder April bis Oktober oder Anfang November beschrieben wurde, wurde im Rahmen eines Experiments im Januar und Februar des Jahres 2007 eine bemerkenswert hohe Anzahl an Zecken in einem Berliner Wald gesammelt. So konnte zum ersten Mal eine winterliche Aktivität von *I. ricinus* in einem zentraleuropäischem Land nachgewiesen werden (DAUTEL *et al.*, 2008). Durch die zunehmende Eroberung neuer Habitate und die temperaturbedingt verlängerte Aktivität der Zecken kommt es zu einem erhöhten Infektionsdruck und einem steigenden Risiko für Mensch und Tier,

von Zecken befallen und durch diese mit von ihnen übertragenen Krankheiten wie LB infiziert zu werden. Diese immer häufiger beobachteten Entwicklungen in der Dynamik der Zeckenpopulation, bedingt durch Veränderungen des Klimas in ganz Europa als auch auf anderen Kontinenten, sollten zum Anlass genommen werden, die präventiven Maßnahmen für Menschen und Tiere zu optimieren und deren Notwendigkeit zu unterstreichen, um die Verbreitung von Krankheiten wie LB einzudämmen.

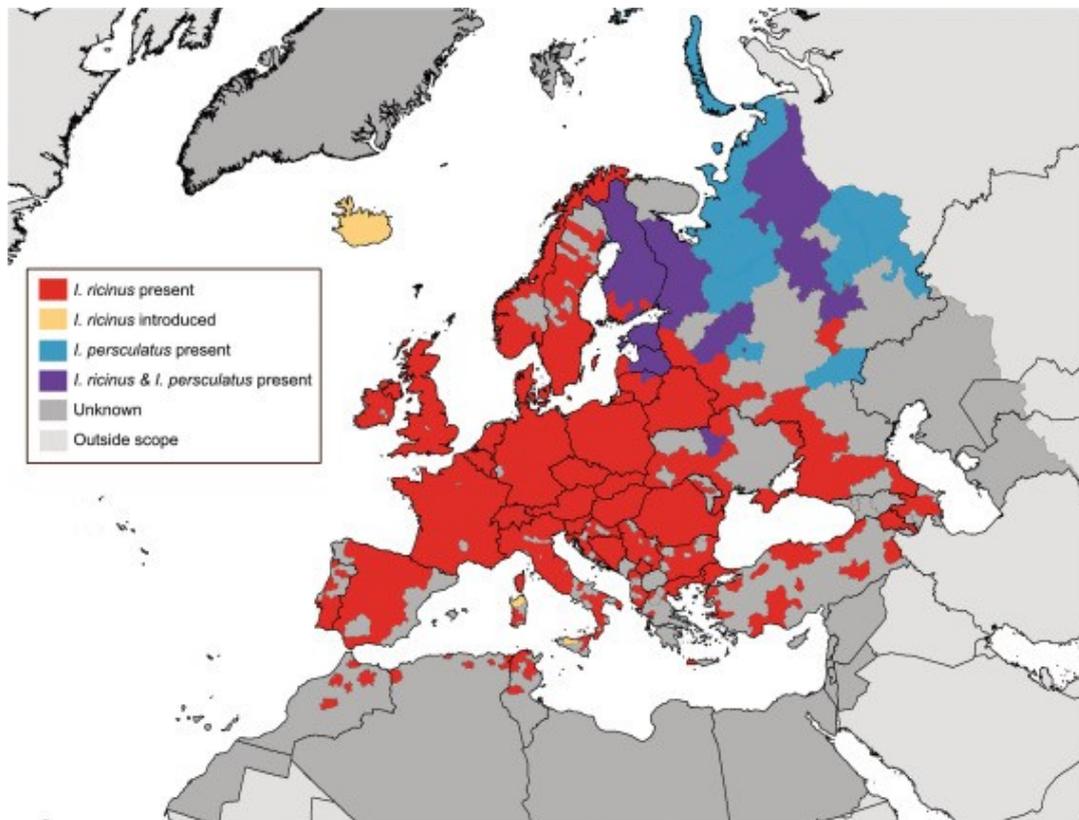


Abbildung 2: Verbreitung von *I. ricinus* und *I. persulcatus* in Europa im Jahr 2022 (KAHL & GRAY, 2023)

2 Lyme-Borreliose: Krankheitsgeschehen

2.1 Infektionsmechanismus

Im Lebenszyklus von Zecken spielt die transovarielle Übertragung von Borrelien keine Rolle. Daher sind Eier und Larven nicht schon zu Beginn ihres Lebens mit den Erregern infiziert, sondern müssen diese durch eine erste Blutmahlzeit an einem bereits infizierten Reservoirwirt aufnehmen (BURGDORFER *et al.*, 1982; MAGNARELLI *et al.*, 1987). Durch chemotaktische Signale erreichen die Borrelien die Lokalisation des Zeckenstiches, von wo sie mit dem aufgenommenen Blut des Reservoirwirts dann in den Mitteldarm der Zecke gelangen (MURFIN *et al.*, 2019). Der dort vorherrschende niedrige pH-Wert sowie die zeckeneigenen Immunmechanismen zwingen die Borrelien zu Evasionsstrategien, um sich erfolgreich zu etablieren und zu überleben (KENEDY *et al.*, 2012). Hierbei kommt dem OspA eine besondere Rolle zu. *Outer surface proteins* (Osp) sind Proteine, die auf der Oberfläche von Bakterien lokalisiert sind und unterschiedliche Rollen im Infektionsmechanismus spielen (RÖTTGERDING *et al.*, 2017; BOOTH *et al.*, 2022). Im Fall der Borrelien sind vor allem OspA und OspC sowie ihre gegenseitige Regulation zu erwähnen (KUROKAWA *et al.*, 2020). Die Expression von OspA ermöglicht den Borrelien die spezifische Bindung an Proteine im Mitteldarm der Zecke (PAL *et al.*, 2000), wie dem TROSPA, welche sich im Epithelium des Zeckendarms befinden (PAL *et al.*, 2004a). Zwar sind die genauen Bindungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt, doch wird dieser Schritt als der erste in der Kolonisation der Borrelien des Mitteldarms der Zecke betrachtet (PAL *et al.*, 2004a; URBANOWICZ *et al.*, 2016). Durch die Bindung von OspA an TROSPA wird den Borrelien ein Verweilen innerhalb der Zecke ermöglicht, bis es zur nächsten Blutmahlzeit kommt. Somit hat dieses Oberflächenprotein vor allem eine Adhäsionsfunktion (FINGERLE *et al.*, 2002; PIESMAN & SCHNEIDER, 2002; KUROKAWA *et al.*, 2020).

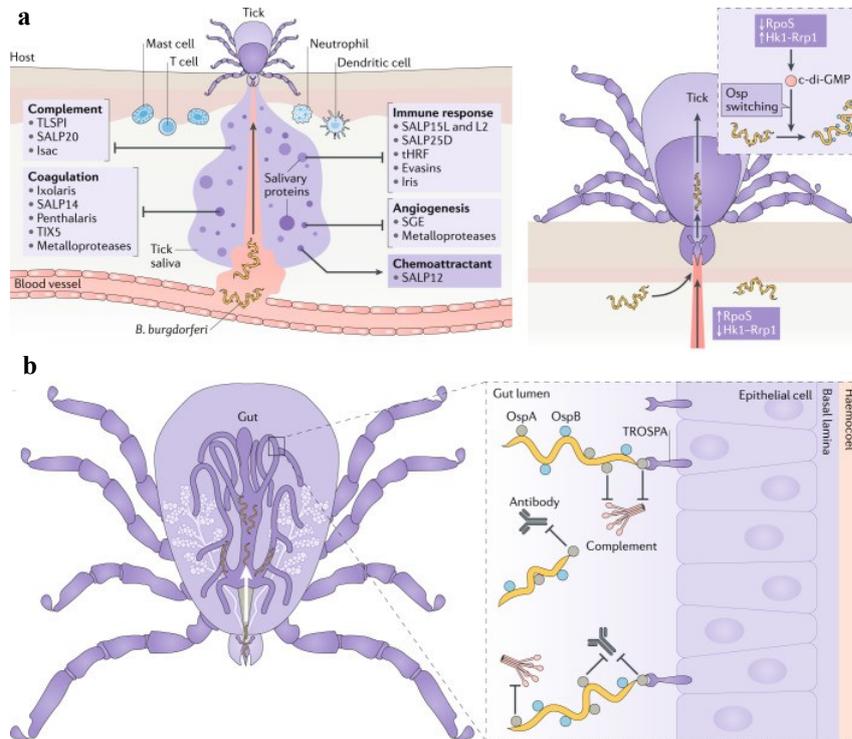


Abbildung 3: Aufnahme von *B. burgdorferi* aus einem infizierten Wirt in die Zecke (KUROKAWA *et al.*, 2020)

a. Während der Blutmahlzeit an einem infizierten Reservoirwirt kommt es zur Aufnahme von *B. burgdorferi* in die Zecke. Speichelproteine der Zecke inhibieren die Entzündungsreaktion des Wirtes und führen so zu einer vermehrten Aufnahme der Borrelien. Nach dieser kommt es zu einer wechselseitigen Beeinflussung verschiedener Moleküle, welche an der Regulierung von Oberflächenproteinen beteiligt sind.

b. Spirochäten, welche mit der Blutmahlzeit aufgenommen werden, gelangen in den Mitteldarm der Zecke und verweilen dort bis zum nächsten Saugakt. Die Expression von Oberflächenproteinen schützt sie vor dem wirtseigenen Immunstrategien und ermöglicht das Verweilen im Mitteldarm. Es kommt vor allem zu einer Interaktion zwischen OspA und TROSPA, ein Rezeptor, welcher sich auf der luminalen Seite des Darmepithels befindet und welcher durch die Aufnahme der Spirochäten in die Zecke hochreguliert wird.

Während des nächsten Saugaktes ist die Übertragung der Spirochäten an der Lokalisation des Zeckenstiches wieder mit Herausforderungen für die Borrelien verbunden, da sich die Gegebenheiten zwischen Vektor und Wirt (Temperatur, pH-Wert, CO₂-Gehalt) verändern (CARROLL *et al.*, 1999; HYDE *et al.*, 2007; KUROKAWA *et al.*, 2020). Durch diese Stimuli kommt es zu einer Veränderung

der Oberflächenstruktur der Borrelien im Mitteldarm der Zecke und einer verringerten Expression von OspA, sowie einer vermehrten Expression von OspC (SCHWAN *et al.*, 1995; RAMAMOORTHY & SCHOLL-MEEKER, 2001). Zwar ist die genaue Beteiligung und der Einfluss von OspC an der Wanderung der Spirochäten vom Mitteldarm über die Hämolymphe zu den Speicheldrüsen der Zecke Gegenstand widersprüchlicher Datenlage, doch entspricht es der allgemein anerkannten Lehrmeinung (GRIMM *et al.*, 2004; PAL *et al.*, 2004a; PAL *et al.*, 2004b; RAMAMOORTHY *et al.*, 2005; TILLY *et al.*, 2006). Sind die Borrelien in den Speicheldrüsen der Zecke angekommen, kommt es zu einer Bindung des Zeckenspeichelproteins Salp15 an das OspC auf der Borrelien-Oberfläche. Dies trägt dazu bei, die Immunmechanismen des Wirtes bei der Transmission zu inhibieren (RAMAMOORTHY *et al.*, 2005). Auch dem Speichel der Zecken selbst kommt eine besondere Bedeutung zu. Er enthält antikoagulative, antiinflammatorische sowie immunmodulierende Moleküle, welche von den Erregern genutzt werden, um den Immunmechanismen des Wirtes auszuweichen (OLIVEIRA *et al.*, 2011; BOULANGER, 2018; CHMELARŤ *et al.*, 2019). Damit die Borrelien erfolgreich in ihren neuen Wirt übertragen werden, muss die Dauer des Saugaktes mindestens 24 bis 48 Stunden betragen (PIESMAN & SINSKY, 1988; PIESMAN, 1993). Je länger die Blutmahlzeit der Zecke dauert, desto wahrscheinlicher wird die Transmission der Pathogene (EISEN, 2018). Allerdings existieren Fallberichte, in denen die experimentelle Übertragung von Borrelien bereits nach 17 Stunden erfolgte (KAHL *et al.*, 1998).

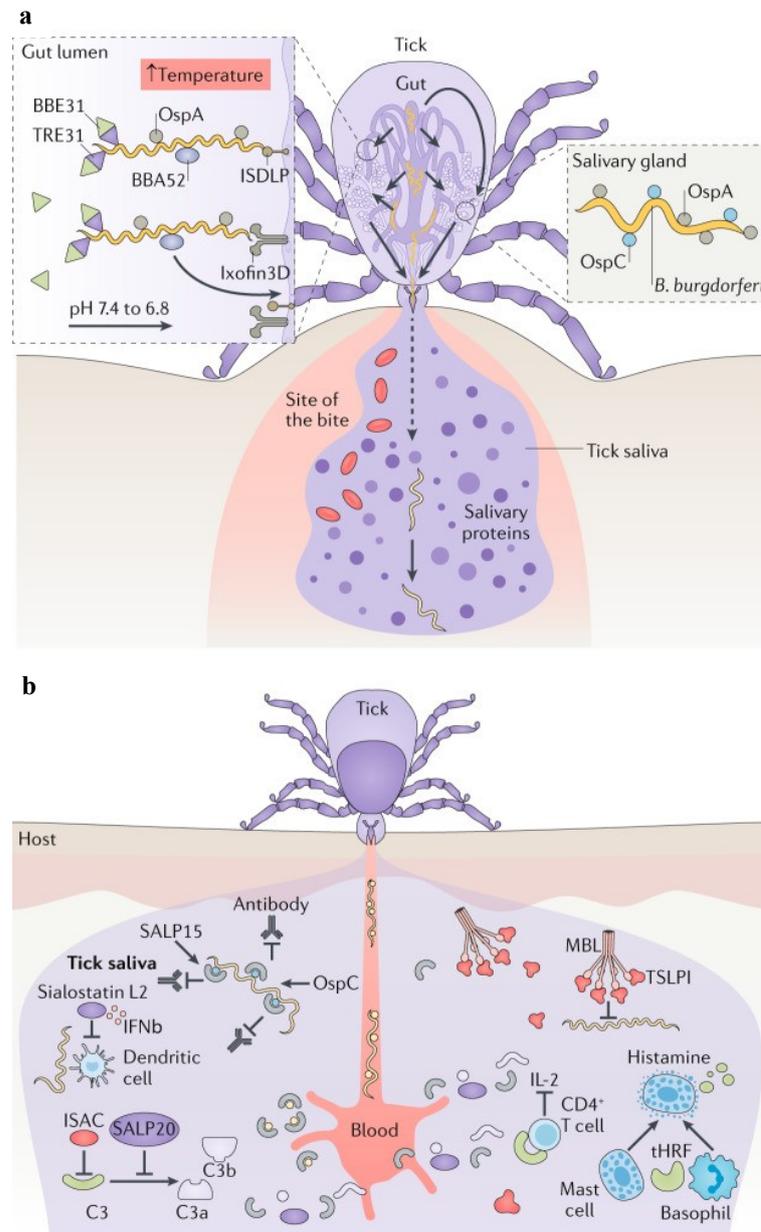


Abbildung 4: Übertragung von *B. burgdorferi* aus der Zecke in einen Wirbeltier-Wirt (KUROKAWA *et al.*, 2020)

a. Die Veränderungen der umgebenden Faktoren wie Temperatur und pH-Wert initiieren die Migration der Borrelien. Auf diesem Weg spielen verschiedene Oberflächenproteine eine wichtige Rolle und ermöglichen den Spirochäten den Austritt aus dem Epithel des Mitteldarms über das Hämocoel in die Speicheldrüsen der Zecke.

b. Bei der Übertragung der Borrelien in einen Säugetierwirt sind verschiedene Proteine im Zeckenspeichel von Bedeutung. Ein Teil von ihnen führt zur Inhibierung des Komplementsystems des Wirtes und trägt zur Transmission der Borrelien bei. Durch andere Zeckenspeichel-Proteine kommt es zu einer Modellierung der Immunantwort des Wirtes auf den Zeckenstich. Die Bindung an das Speichelprotein Salp15 schützt die Spirochäten vor Antikörper-induzierter Neutralisierung.

2.2 Immunreaktion nach Infektion mit *Borrelia burgdorferi*

Das Immunsystem eines Wirtes, bestehend aus einem angeborenen und einem adaptiven, spezifischen Teil, ist entscheidend für den Schutz eines Organismus vor Pathogenen und Infektion (BALDWIN *et al.*, 2023). Während der Übertragung der Borrelien über den Zeckenspeichel ist es unvermeidlich, mit der Immunabwehr ihres neuen Wirtes in Kontakt zu kommen (KOGAN *et al.*, 2022). An der Lokalisation des Zeckenstiches kommt es zu ersten unspezifischen Reaktionen des angeborenen Immunsystems: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN), Makrophagen und Plasmazellen wandern ein (HÄRTER *et al.*, 1999; STEERE *et al.*, 2004). Bei ihrem weiteren Weg durch das Wirtsgewebe bleiben die Borrelien vorwiegend im extrazellulären Raum und locken weitere neutrophile Granulozyten an, welche durch ihre Degranulierung eine Entzündungsreaktion initiieren (STRAUBINGER *et al.*, 1997a; HÄRTER *et al.*, 1999). Die klinischen Veränderungen treten vor allem in Gelenken auf, können aber auch im Herzmuskel oder im Nervensystem vorkommen (STEERE, 1989). In diesen Geweben kommen viele kollagene Fasern mit einem hohen Anteil an Glykosaminoglykanen vor. An diese wiederum können Borrelien binden, da sie einen Glykosaminoglykan-Rezeptor besitzen (ISAACS, 1994; LEONG *et al.*, 1995; PARVEEN & LEONG, 2000). Im Anschluss kommt es zu spezifischen Abwehrmechanismen des humoralen Immunsystems. Es kommt zur Bildung von Immunglobulin (Ig) M, deren Auftreten kennzeichnend ist für die frühe Phase der Infektion. Im weiteren Verlauf des Infektionsgeschehens erfolgt ein Klassenwechsel von IgM zu IgG (CRAFT *et al.*, 1984). Diese lassen sich ab einem Zeitraum von vier bis sechs Wochen nach Infektion erstmals nachweisen und konnten in experimentell infizierten Hunden nach 560 Tagen immer noch detektiert werden (STRAUBINGER, 2000). Betrachtet man im frühen Infektionsgeschehen die Antikörper genauer, sind es vor allem Antikörper gegen OspC und Flagellin (p41), die in Seren von mit *Bbsl* infizierten Menschen und Hunden nachgewiesen werden können (AKIN *et al.*, 1999). Da es allerdings zu Kreuzreaktionen mit Flagellinen anderer Bakterien kommen kann, sollte diese Antikörperreaktion bei Hunden nicht als spezifischer Marker für eine Infektion mit LB betrachtet werden (SHIN *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 2012). Während die gegen OspC gerichteten Immunglobuline im späteren Verlauf der Infektion wieder abfallen, kommt es während des gesamten Infektionsgeschehens weder bei Menschen noch Hunden zu einer nennenswerten Bildung von Antikörpern gegen OspA, da

dieses bereits in der Zecke herunter reguliert werden (STEERE, 1989; LEVY *et al.*, 1993). Die Bildung und der Klassenwechsel der Immunglobuline des Wirtes haben die Elimination der Erreger zum Ziel. PMNs und Makrophagen sollen eine Phagozytose initiieren, und die Aktivierung des Komplementsystems soll zur Lyse der Bakterien führen (AYDINTUG *et al.*, 1994; COLLINS, 2016). Um im Wirt zu persistieren und so zu einer chronischen LB zu führen, müssen die Borrelien dessen Abwehrreaktionen umgehen und eigene, immunevasive Mechanismen entwickeln, um sich der Immunantwort des Wirbeltierwirts zu entziehen (KARVONEN *et al.*, 2021; COMBS *et al.*, 2022). Das Oberflächenprotein VlsE, ein hochvariables Protein, spielt eine entscheidende Rolle als Virulenzfaktor. Es besteht in seinem Zentrum aus hochkonstanten Bereichen, die *invariable region, IR 1-6*, welche sich nicht verändern können und somit die Bildung als auch Bindung von spezifischen und früh induzierten Antikörpern hervorrufen (ZHANG *et al.*, 1997; LIANG *et al.*, 1999; PHILIPP *et al.*, 2001). In der *variable region*, dem variablen Bereich des Proteins hingegen, kommt es immer wieder zu Veränderungen der Aminosäuresequenz, was zu einer Variation der Antigenstruktur führt. Durch diese beständige Veränderung der Struktur werden vom Wirt gebildete Antikörper unwirksam, da sie durch die Oberflächenvariation keine geeigneten Bindungsstellen mehr finden (ZHANG *et al.*, 1997; ZHANG & NORRIS, 1998; EICKEN *et al.*, 2002; MCDOWELL *et al.*, 2002). Diese Variabilität ermöglicht es den Borrelien, dem wirtsseitigem Immunsystem zu entgehen, in ihm zu persistieren und eine chronische Infektion zu etablieren (ZHANG *et al.*, 1997; ZÜCKERT, 2013).

2.3 Krankheitsbild der Lyme-Borreliose beim Hund

Die Diagnose sowie die Therapie von LB bei Hunden wird durch die Tatsache erschwert, dass nicht alle infizierten Hunde eindeutige klinische Anzeichen zeigen (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). In den letzten Jahren tauchte immer wieder die These auf, dass nur 5 % der infizierten Hunde klinisch auffällig werden. Diese Zahl stammt aus einer von Levy *et al.* veröffentlichten Studie (LEVY & MAGNARELLI, 1992) und wurde in den folgenden Jahren wiederholt zitiert. Andere Studien zeigen jedoch deutlich abweichende Ergebnisse. In einem dieser Versuche konnten bei 75 % der experimentell infizierten Hunde klinische Manifestationen festgestellt werden (STRAUBINGER *et al.*, 1997a). Straubinger *et al.* beschrieben in einem anderen Experiment bei 69 % der Hunde klinische Auffälligkeiten (STRAUBINGER, 2000). In einem weiteren Versuch zeigten 77 % der Hunde Anzeichen einer klinischen Erkrankung (CALLISTER *et al.*, 2000). Während das EM das früheste und häufigste Symptom in der Humanmedizin ist (STEERE, 1989), findet man diese kutane Manifestation nicht bei infizierten Hunden (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1997b). Das Krankheitsbild der Arthritis gehört zu den am häufigsten beschriebenen Anzeichen der LB beim Hund und kann sowohl bei experimentell als auch natürlich infizierten Hunden auftreten (APPEL *et al.*, 1993; LAFLEUR *et al.*, 2010; LESCHNIK *et al.*, 2010). Es kommt zu Schmerzen und Schwellungen in den betroffenen Gelenken, was zu klinisch manifester Lahmheit unterschiedlicher Ausprägung führt. Zwar kann eine solche ohne adäquate Therapie nach wenigen Tagen abklingen, allerdings sind rezidivierende Lahmheiten, auch an unterschiedlichen Gliedmaßen im Sinne einer Polyarthritits beschrieben (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1997a; STRAUBINGER *et al.*, 1998). Bei experimentell infizierten Hunden wird eine häufige Korrelation zwischen der Seite der Zeckenexposition und der Lokalisation der Beschwerden beschrieben (STRAUBINGER, 2000). In Punktaten der betroffenen Gelenke konnten ein vermehrter Zellgehalt, dominiert von PMNs, sowie ein erhöhtes Volumen an Synovialflüssigkeit festgestellt werden (STRAUBINGER *et al.*, 1997a; STRAUBINGER *et al.*, 1998). Abgeschlagenheit, Lethargie und reduziertes Fressverhalten sowie Erhöhungen der Körpertemperatur bis hin zu Fieber können auftreten (APPEL, 1990; AZUMA *et al.*, 1994; STRAUBINGER *et al.*, 1997a; CALLISTER *et al.*, 2000). Aber auch in anderen Organsystemen sind in der Lite-

ratur klinische Manifestationen der LB beim Hund beschrieben. Verschiedene Formen der Glomerulonephritis wurden 1997 erstmals in Zusammenhang mit Borrelien-Infektionen erwähnt. An Nephritis erkrankte Hunde waren signifikant jünger als solche, die an anderen Formen von Nephropathien erkrankten und zeigten Anorexie, Erbrechen, Lethargie sowie Gewichtsverlust. Des Weiteren zeigten die erkrankten Tiere Azotämie, Urämie und Proteinurie (DAMBACH *et al.*, 1997). Auch Hyperphosphatämie wurde im Zusammenhang zwischen seropositiven Hunden und einer *protein-losing nephropathy* beschrieben (BORYS *et al.*, 2019). Detmer *et al.* beschreiben plötzliche Todesfälle von unter 16 Wochen alten Welpen, bei welchen eine polygranulomatöse Myokarditis diagnostiziert wurde. Bei all diesen Welpen wurde *B. burgdorferi* immunhistochemisch nachgewiesen. Die festgestellten Läsionen der postmortalen Untersuchung der Herzen war bei allen Welpen ähnlich (DETMER *et al.*, 2016). Bei einem weiteren Fall konnte in einer Probe von Herzgewebe genetisches Material von Borrelien nachgewiesen werden. Der euthanasierte Hund zeigte vier Wochen nach einem Befall mit Zecken Anzeichen von Lahmheit und Herzversagen, welche nicht auf eine antibiotische Therapie ansprechen. Serologische Untersuchungen identifizierten außerdem spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* (ADASZEK *et al.*, 2020). Auch neurologische Auffälligkeiten werden in der Literatur aufgeführt. Nach dem Befall mit Zecken wurden in zwei Fällen Astasie, Hyperreflexie und tonische Muskelkrämpfe bei Hunden beschrieben. In den Serumproben beider Tiere konnten spezifische Antikörper gegen *B. burgdorferi* nachgewiesen werden. Die neurologischen Anzeichen klangen in beiden Fällen schon kurz nach Beginn einer antibiotischen Therapie ab und die Hunde zeigten eine deutliche Verbesserung des klinischen Allgemeinzustandes (AZUMA *et al.*, 1993).

2.4 Krankheitsbild der Lyme-Borreliose beim Menschen

Die klinischen Symptome einer humanen LB werden eingeteilt in ein frühes lokales, ein frühes disseminiertes sowie ein spätes Krankheitsstadium (KALISH *et al.*, 1993; STEERE *et al.*, 2016). Da es aber zu individuellen Unterschieden im Krankheitsverlauf kommen kann, ist diese Einteilung als eine theoretische zu betrachten, die nicht immer den tatsächlichen Symptomen oder ihrem zeitlichen Auftreten entspricht (WORMSER *et al.*, 2006; STANEK *et al.*, 2012). Eine weitere Einteilung kann in Frühmanifestationen, welche nach Tagen bis Wochen, und in Spätmanifestationen, welche nach Monaten bis Jahren auftreten, erfolgen (STEERE, 1989). Die Unterschiede in der Häufigkeit und Ausprägung der Symptome auf dem europäischen und nordamerikanischen Kontinent sind auf die geographische Diversität der Erreger zurückzuführen (STANEK *et al.*, 2012; MEAD, 2015). Jede der Spezies – *Bbss*, *B. afzelii* und *B. garinii* – kann mit einem gewissen Gewebstropismus in Verbindung gebracht werden (VAN DAM *et al.*, 1993). *Bbss* steht häufig in Verbindung mit Gelenksveränderungen sowie kardiologischen Symptomen (MUEHLENBACHS *et al.*, 2016). *B. garinii* ist oftmals mit neurologischen Symptomen assoziiert (LIN *et al.*, 2020) und *B. afzelii* ist häufig in Zusammenhang mit Manifestationen der Haut zu finden (STANEK *et al.*, 2012).

Tabelle 1: Manifestationen der LB in Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium beim Menschen, modifiziert nach Robert Koch-Institut (ROBERT KOCH-INSTITUT, 2019)

Krankheitsstadium	Kutane Manifestationen	Neurologische Manifestationen	Weitere Manifestationen
früh lokal	EM, Borrelien-Lymphozytom		
früh disseminiert	Multiple EM, multiple Borrelien-Lymphozytome	frühe Neuroborreliose	Lyme-Karditis, frühe Lyme-Arthritis
spät	ACA	späte Neuroborreliose	chronische Lyme-Arthritis

EM: *Erythema migrans*; ACA: *Acrodermatitis chronica atrophicans*.

2.4.1 Frühes, lokales Krankheitsstadium beim Menschen

In einem frühen Stadium der Infektion kann es zu grippeähnlichen Symptomen wie Unwohlsein, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Fieber kommen, vor oder gleichzeitig mit dem Auftreten eines EM (STEERE *et al.*, 1983a). Das EM ist das häufigste und früheste klinische Symptom der LB in der Humanmedizin (STEERE, 1989; BERGLUND *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um eine sich zentrifugal ausbreitende Rötung der Haut (Wanderröte, *Erythema migrans* (EM)), welche nicht schmerzhaft ist und eine Entzündungsreaktion an der Lokalisation des Zeckenstiches darstellt (STEERE, 1989). Es kann bereits ein bis zwei Wochen nach der Infektion auftreten (SMITH *et al.*, 2002). In der Regel kommt es nach einer Persistenz von Tagen bis Wochen zu einer spontanen Abheilung oder einem Verschwinden durch eine eingeleitete, antibiotische Therapie (GADE *et al.*, 2022; STRLE & WORMSER, 2022). Eine weitere frühe, kutane Manifestation ist das Borrelien-Lymphozytom, welches häufiger bei Kindern zu finden ist (REZAZADEGAN *et al.*, 2022). Es handelt sich um eine schmerzfreie, erythematöse Hautläsion von nodulärem Charakter und tritt im Gegensatz zu den anderen Hautveränderungen häufiger bei Männern auf (MARASPIN & STRLE, 2022). Beim Borrelien-Lymphozytom kann es, ebenso wie beim EM, zu einer spontanen Abheilung kommen (GADE *et al.*, 2022).



Abbildung 5: Ausprägung eines EM zu einem frühen Zeitpunkt (a) und nach acht Tagen (b) (TREVISAN *et al.*, 2022)

2.4.2 Frühes, disseminiertes Krankheitsstadium beim Menschen

In Europa leiden 10-15 % der an LB erkrankten Patienten zudem an neurologischen Symptomen, welche unter dem Begriff der Neuroborreliose zusammengefasst werden (HALPERIN, 2011). Die ersten klinischen Anzeichen treten zumeist vier bis sechs Wochen nach dem Zeckenstich auf. Je nachdem, ob die Symptome kürzer oder länger als sechs Monate vorhanden sind, wird zwischen einer frühen, akuten und einer späten, chronischen Form unterschieden.

Tabelle 2: Einteilung der Neuroborreliose nach Dauer und Symptomen, modifiziert nach Mygland *et al.* (MYGLAND *et al.*, 2010).

	Frühe, akute Neuroborreliose	Späte, chronische Neuroborreliose
Dauer der neurologischen Symptome	< 6 Monate	> 6 Monate
Auswirkungen auf das PNS	Bannworth-Syndrom Lymphozytäre Meningitis Plexus-Neuritis Mononeuritis multiplex	Mononeuropathie Radikulopathie Polyneuropathie ACA
Auswirkungen im ZNS	Myelitis Enzephalitis Zerebrale Vaskulitis	Enzephalitis Enzephalomyelitis Zerebrale Vaskulitis

PNS: Peripheres Nervensystem; ZNS: Zentrales Nervensystem; ACA: *Acrodermatitis chronica atrophicans*.

Das häufigste Symptom einer akuten Neuroborreliose ist eine Meningoradikulitis, das sogenannte Bannwarth-Syndrom (ACKERMANN *et al.*, 1984; MYGLAND *et al.*, 2010). Die Betroffenen leiden an radikulären Schmerzen, Paresen der Hirnnerven (z.B. Fazialisparese), sowie Kopfschmerzen. Myelitis, Meningitis und Enzephalitis können ebenfalls auftreten (OSCHMANN *et al.*, 1998; MYGLAND *et al.*, 2010).

Die Lyme-Karditis, welche in Nordamerika häufiger zu finden ist und im Durchschnitt 21 Tage nach dem Auftreten eines EM eine klinische Symptomatik hervorrufen kann (STEERE *et al.*, 1980; MCALISTER *et al.*, 1989), präsentiert sich in Zusammenhang mit hochgradigen atrioventrikulären Blocks, Synkopen, Dyspnoe oder Brustschmerzen (FISH *et al.*, 2008; YEUNG & BARANCHUK, 2019).

2.4.3 Spätes Krankheitsstadium der Lyme-Borreliose beim Menschen

Als späte oder chronische klinische Erscheinung der Haut gilt die *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA). Was sich zunächst als bläulich bis rötliche, entzündliche Läsion der Haut vor allem an den distalen Gliedmaßen präsentiert, kann unbehandelt zu einer chronischen Hautatrophie und Fibrose werden und zu Bewegungseinschränkungen sowie Gelenk- und Muskelschmerzen führen (ZAJKOWSKA *et al.*, 2011; MONIUSZKO-MALINOWSKA *et al.*, 2018). Da möglicherweise ein direkter Zusammenhang mit einer durch *B. afzelii* verursachten Infektion besteht, ist dieses Symptom in Europa wesentlich häufiger anzutreffen als in Nordamerika und kann in annähernd 10 % der an Lyme-Borreliose erkrankten Personen beobachtet werden (GADE *et al.*, 2022).

Patienten, welche an chronischer Neuroborreliose erkrankt sind, können Mono- und Polyneuropathien (LOGIGIAN *et al.*, 1990), zerebrale Vaskulitis, progressive Enzephalitis oder Enzephalomyelitis (PFISTER & RUPPRECHT, 2006) zeigen. Erkrankte Personen leiden an Einschränkungen des Erinnerungsvermögens, Schlafstörungen, Stimmungsschwankungen, Kopfschmerzen sowie Hörverlust (LOGIGIAN *et al.*, 1990).

Das muskuloskelettale System betreffend, ist die Lyme-Arthritis die häufigste pathologische Veränderung der LB im Spätstadium in Nordamerika und tritt zumeist Monate nach dem ursächlichen Zeckenstich auf (ARVIKAR & STEERE, 2015). Sie präsentiert sich als Mono- oder Oligoarthritis, begleitet von Schwellungen und Schmerzen. Häufig sind die Kniegelenke betroffen, üblicherweise treten die Beschwerden aber an nicht mehr als in fünf Gelenken auf (STEERE *et al.*, 1987; LONG & COHN, 2018).

2.5 Diagnose der Lyme-Borreliose

Bei entsprechenden klinischen Erscheinungen von Hunden mit der Verdachtsdiagnose LB sowie einer Evaluierung des Expositionsrisikos für Zecken, sollte nach einer eingehenden klinischen Allgemeinuntersuchung eine serologische Diagnostik erfolgen. In der Tiermedizin wird die Diagnose in der Regel durch den indirekten Nachweis spezifischer Antikörper im Blutserum gestellt. Die Ergebnisse werden in Zusammenhang mit den bestehenden klinischen Anzeichen evaluiert. Empfohlen wird eine sogenannte Zweistufen-Diagnostik, bestehend aus einem Such- und einem Bestätigungstest (JOHNSON *et al.*, 1996; WILSKE *et al.*, 2007). Die erste Stufe dieser diagnostischen Herangehensweise stellt die Suche nach spezifischen Antikörpern gegen *Bbsl* dar. Hierfür kann ein Immunfluoreszenztest (IFT) oder ein ELISA angewandt werden (RUSSELL *et al.*, 1984; MAGNARELLI & ANDERSON, 1987). Ein Immunoblot kann in der zweiten Stufe eine vorliegende Infektion mit Borrelien bestätigen (JOHNSON *et al.*, 1996; WILSKE *et al.*, 2007). Die Kultivierung und anschließende mikroskopische Darstellung von Borrelien aus verschiedenem Probenmaterial wie Hautbiopsien, Gewebsbiopsien, Synovia oder Cerebrospinalflüssigkeit (BERGER *et al.*, 1992), sowie die Amplifizierung der borrelialen DNA durch PCR (ROSA & SCHWAN, 1989; ROSA *et al.*, 1991) stellen direkte Nachweisverfahren der Erreger dar. Allerdings ist die Kultivierung der Erreger sehr anspruchsvoll und zeitaufwendig in der Durchführung. Sie kann bis zu sechs Wochen in Anspruch nehmen, was der Empfehlung einer frühzeitig eingeleiteten Therapie widerspricht (BARBOUR, 1984; PREAC-MURSIC *et al.*, 1991; WANG *et al.*, 2001). Auch der Nachweis der Borrelien-spezifischen DNA mittels PCR ist mit einigen Herausforderungen verbunden. Ist die Erregermenge in den Gewebeproben zu gering oder liegt sie unter dem Detektionslimit, sind falsch-negative Resultate möglich (STRAUBINGER, 2000; NUNES *et al.*, 2018). Aufgrund der Komplexität, des Zeitaufwandes und der Fehleranfälligkeit der direkten Nachweismethoden stellt der indirekte Nachweis das Mittel der Wahl dar und ist in der Tiermedizin vornehmlich anzutreffen (STEERE *et al.*, 1983b; DRESSLER *et al.*, 1993). In der für diese Arbeit zugrunde liegenden, retrospektiven Studie wurde für den indirekten Nachweis der Erreger mittels Antikörperbestimmung ein KELA durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nachfolgend mit einem LIA bestätigt. Da diese als auch die weiteren zur Verfügung stehenden Methoden bereits in anderen Arbeiten ausführlich und detailgenau beschrieben wurden, sollen im Folgenden nur

die spezifisch angewandten Testverfahren dieser Studie erwähnt werden (APPEL *et al.*, 1993; VAN HOECKE *et al.*, 1999; TOPFER & STRAUBINGER, 2006; BARTH *et al.*, 2014; DOFF *et al.*, 2022).

2.5.1 KELA (ELISA)

Als modifizierter ELISA steht der KELA zur Antikörperdetektion zur Verfügung. Hierbei wird eine Mikrotiterplatte mit dem Detektionsantigen beschichtet. Wird im Anschluss die zu untersuchende Probe in diesen beschichteten Mikrotiterplatten ausreichend inkubiert, binden spezifische Antikörper an den Antigenen der Platte, wohingegen unspezifische Bindungen durch Waschvorgänge entfernt werden. Im Anschluss wird ein Enzym-markierter Sekundärantikörper aufgetragen, der bei Zugabe des passenden Substrats einen Farbumschlag anzeigt. Somit kann der Gesamtgehalt an spezifisch gebundenen Antikörpern bestimmt werden. Bei einem ELISA, bei welchem Borrelien-Lysat als Antigen genutzt wird, kann keine Differenzierung zwischen impfinduzierten und infektiionsbedingten Antikörpern vorgenommen werden (CHANG *et al.*, 1995; JACOBSON *et al.*, 1996). Die automatisierte sowie benutzerfreundliche Durchführung des KELAs stellen einen großen Vorteil dar (SHIN *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 1995). Ziel ist es, die Kinetik der Immunkomplexbildung zu erfassen und zu messen. Hierfür kommt es in einem vorgegebenem Zeitintervall zu dynamischen Messungen der Extinktion. Die gemessene Kurve, also die Rate der Enzym-Substrat-Reaktion, ist direkt proportional zur Menge an Antikörpern in der untersuchten Probe (TSANG *et al.*, 1980). Die Messungen werden computergestützt durchgeführt. Vorangegangene Fehler in der Probenvorbereitung (z. B. Pipettierfehler) oder bei der Anwendung des Computersystems können so gefunden werden, wenn keine lineare Reaktionskurve als Ergebnis erscheint (BACON *et al.*, 2003).

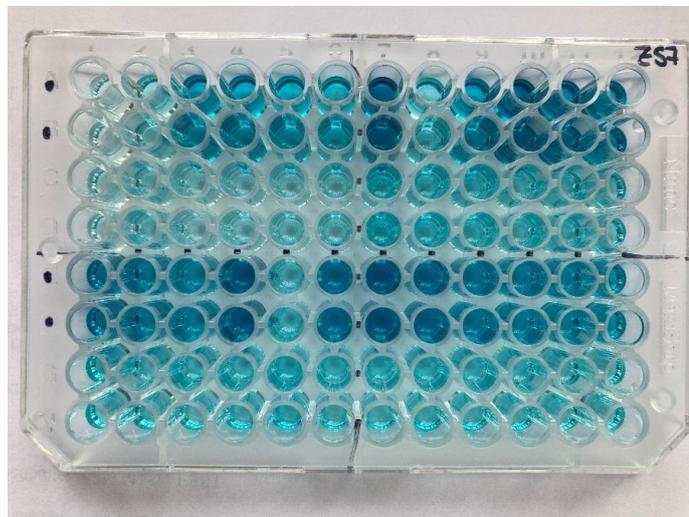


Abbildung 6: Farbumschlag auf einer Mikrotiterplatte nach durchgeführtem KELA

2.5.2 LIA (Immunoblot)

Der LIA ist eine Immunoblot-Methode und eine Weiterentwicklung des klassischen Western-Blots, bei dem die Auftrennung der Antigene nach ihrer molekularen Größe erfolgt (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005). Er dient als semiquantitativer Nachweis einer Borrelieninfection, außerdem ist eine Unterscheidung von infizierten und geimpften Tieren möglich (BARTH *et al.*, 2014). Durch bestimmte Verfahren werden die Erregerantigene auf eine Nitrozellulosemembran gesprüht. Beim Auftragen der zu untersuchenden Proben kommt es, sofern Antikörper vorhanden sind, zur Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen, welche durch enzymmarkierte Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden (HULÍNSKÁ, 1997). Die Vorteile des LIA bestehen in der Möglichkeit, zusätzliche Antigene im Vergleich zum Western-Blot zu testen, außerdem kann eine separate Beurteilung der Immunreaktion von Proteinen mit gleichem molekularem Gewicht erfolgen (WILSKE *et al.*, 2007). Der Einsatz von rekombinanten Antigenen erhöht die Spezifität dieses Testverfahrens, indem Antigene verschiedener relevanter Borrelien-Spezies verwendet werden (GOETTNER *et al.*, 2005). Allerdings unterliegt die Interpretation der Ergebnisse, also die Farbintensität der Banden je nach Test, einer subjektiven Beurteilung und unterliegt somit gewissen Limitationen (ROBERTSON *et al.*, 2000).

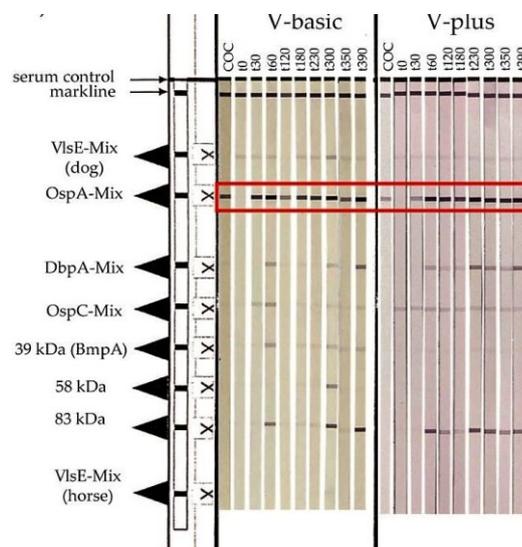


Abbildung 7: Antikörperverlauf der Studiengruppen *V-basic* und *V-plus* während des Beobachtungszeitraums, dargestellt mit Borrelia Veterinär plus OspA LINE (WILCZEK *et al.*, 2022)

2.5.3 SNAP[®] 4Dx Plus (ELISA)

Bei dem SNAP[®] 4Dx Plus (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Schnelltest, welcher sich aufgrund seiner leichten Durchführbarkeit und schnellen Resultaten für den Nachweis einer Borrelieninfection für die Anwendung unter Praxisbedingungen eignet (LEVY *et al.*, 2002). Die Detektion von Antikörpern beruht auf einer Reaktion mit dem C6-Peptid. Dieses ist Bestandteil der *invariable region* des variablen Oberflächenproteins VlsE. Da Antikörper gegen VlsE spezifisch für eine Infektion mit *Bbsl* sind, und der Test nicht mit impfinduzierten Antikörpern kreuzreagiert, ist eine Differenzierung zwischen infizierten und geimpften Hunden möglich (LIANG *et al.*, 2000; O'CONNOR *et al.*, 2004).

2.6 Therapie der Lyme-Borreliose

Das zeitliche Intervall zwischen dem Auftreten der klinischen Anzeichen und der Diagnosestellung einer LB ist von entscheidender Bedeutung für den Therapieerfolg (ASCH *et al.*, 1994). Werden Hunde rechtzeitig und in einem frühen Infektionsstadium adäquat antibiotisch versorgt, so steigt die Erfolgsquote der Behandlung und eine Verbesserung der klinischen Anzeichen kann bereits nach drei Tagen beobachtet werden (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Für eine möglichst erfolgreiche Therapie spielt auch die Behandlungsdauer eine wichtige Rolle. Aufgrund des biologischen Verhaltens der Borrelien im Wirt und der Annahme, dass es zum Zeitpunkt der Diagnose schon zu einer Verteilung in verschiedenen Körpergeweben gekommen sein kann, so wie einer langen Generationszeit der Borrelien, wird eine Therapielänge von mindestens 28 Tagen angeraten (BARBOUR, 1984; STRAUBINGER *et al.*, 1997b; STRAUBINGER, 2000; WANG *et al.*, 2004; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; LITTMAN *et al.*, 2018). Doch auch wenn Hunde ordnungsgemäß und den Empfehlungen folgend, also früh im Krankheitsverlauf und mit ausreichender Länge, behandelt werden, kann eine vollständige Erregerfreiheit nicht immer gewährleistet werden. In einer Studie mit experimentell infizierten Hunden konnten bei einer geringen Anzahl der Tiere im Anschluss an die Behandlung mit verschiedenen Antibiotika sowie postmortal Borrelien mittels kultureller Anzucht und PCR in entnommenen Hautbiopsien nachgewiesen werden (STRAUBINGER *et al.*, 1997b; WORMSER & SCHWARTZ, 2009). Die Therapie mit antibiotischen Wirkstoffen verringert die Zahl der Borrelien im Wirt, dennoch ist es einem Teil der Spirochäten möglich, zu überleben und eine LB mit chronischer Ausprägung hervorzurufen (STRAUBINGER *et al.*, 1998). Beim Hund wird zur medikamentösen Behandlung in der Regel der Wirkstoff Doxycyclin, ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracykline, in der Dosierung von bis zu 10 mg/kg alle 12 oder 24 Stunden eingesetzt (STRAUBINGER *et al.*, 1998; CHOMEL, 2015; LITTMAN *et al.*, 2018). Doxycyclin eignet sich ebenfalls aufgrund der Wirksamkeit gegen mögliche Coinfektionen mit beispielweise *Anaplasma* spp., sowie seiner antiarthritischen und antientzündlichen Eigenschaften (LITTMAN *et al.*, 2018). Ein weiterer, empfohlener Wirkstoff ist das β -Lactam-Antibiotikum Amoxicillin, zu dessen Wirkspektrum auch Borrelien zählen (SICKLINGER *et al.*, 2003). Es wird in einer Dosis von 20 mg/kg alle acht Stunden verabreicht (STRAUBINGER *et al.*, 1998; LITTMAN *et al.*, 2018). In einer 2015 veröffentlichten Studie wurde

gezeigt, dass die zweimalige, subkutane Injektion des Wirkstoffes Cefovecin, ein Cephalosporin, in einem Abstand von 14 Tagen, zu vergleichbaren Ergebnissen wie die Behandlung mit Doxycyclin und Amoxicillin über 31 Tage führt (WAGNER *et al.*, 2015). Hierbei ist zu beachten, dass es sich um ein Cephalosporin der 3. Generation handelt, also einen Wirkstoff von besonderer Bedeutung für die Humanmedizin. Der Einsatz dieses Wirkstoffes ist auch im Fall einer Zulassung für die betreffende Tierart in Deutschland an strikt einzuhaltende Regularien gebunden (BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2018). In experimentellen Studien wurden außerdem Therapieansätze mit Azithromycin, einem Makrolidantibiotikum, in einer Dosis von 25 mg/kg einmal täglich oral, sowie einer intravenösen Gabe von 25 mg/kg Ceftriaxon, einem Cephalosporin der 3. Generation, verfolgt (STRAUBINGER *et al.*, 1998). Hierbei ist zu beachten, dass für keinen dieser beiden Wirkstoffe zum jetzigen Zeitpunkt veterinärmedizinische Präparate zur Verfügung stehen.

3 Präventivmaßnahmen gegen die Lyme-Borreliose

Um Hunde bestmöglich vor einer Infektion mit Borrelien, übertragen durch Zecken, und der Erkrankung an LB zu schützen, stehen mehrere Maßnahmen zur Verfügung. Die Prävention stützt sich auf drei Säulen: manuelle Zeckenentfernung, Gebrauch von Repellentien oder Ektoparasitika, sowie die Impfung gegen LB (HONSBERGER *et al.*, 2016; OTRANTO, 2018; KRAMER *et al.*, 2020; CAMIRE *et al.*, 2021). In welcher Kombination diese präventiven Maßnahmen angewandt werden, sollte für jeden Hund individuell zwischen Veterinär und Besitzer auf die Lebensumstände des Tieres abgestimmt werden. Damit Tierärzte die bestmögliche Beratung leisten können, ist es unabdingbar, dass sie ausreichende Kenntnis über das Infektionsgeschehen der LB besitzen. Nicht zu unterschätzen ist auch die Gefährdung der Hundebesitzer und anderer Menschen, schließlich handelt es sich um eine Zoonose. Die LB ist eine auf indirektem Weg, also durch Vektoren, übertragene Erkrankung (WILSON *et al.*, 2020; ALCON-CHINO & DE-SIMONE, 2022; MARTIN & ZIMMERLI, 2022). Larven und Nymphen können während der Blutmahlzeit an einem infizierten Hund Borrelien aufnehmen und durch ihren Wirt in Grünanlagen, Gärten oder Parks verbracht worden sein. Durch die transstadielle Übertragung können sie nun auch nach der Häutung in ihrem folgenden Lebensstadium dort Menschen beim nächsten Saugakt mit Borrelien infizieren (DAY, 2011). Außerdem ist zu bedenken, dass durch die zunehmend ganzjährige Aktivität der Zecken nicht mehr nur in den Sommermonaten Gebrauch von den präventiven Maßnahmen gemacht werden sollte, sondern der Schutz vor Zeckenbefall und somit möglicher Infektion über das ganze Jahr hinweg gewährleistet werden muss (GRAY *et al.*, 2009).

3.1 Manuelle Entfernung von Zecken

Die erste Säule der LB-Prävention stellt auch die essenziellste dar – manuelle Zeckenentfernung. Die Übertragung von Borrelien aus der Zecke in den Wirt ist umso wahrscheinlicher, je länger die Blutmahlzeit dauert (EISEN, 2018). Zwar nimmt sie mindestens 24 bis 48 Stunden in Anspruch (PIESMAN, 1988; PIESMAN & SINSKY, 1988; PIESMAN, 1993), dennoch existieren vereinzelt Berichte einer erfolgreichen Übertragung nach bereits 17 Stunden (KAHL *et al.*, 1998). Daher sollten Zecken schnellstmöglich, im besten Fall noch nicht angesaugt, von Hunden entfernt werden. Um dies zu gewährleisten, sollten Hunde nach jedem Spaziergang, zumindest aber einmal täglich, gründlich abgesucht werden, was sich aufgrund des Fells der Tiere mitunter als schwierig gestalten kann und Zecken leicht übersehen werden können. Für die Entfernung stehen verschiedene, kommerziell erhältliche Hilfsmittel wie Zeckenpinzetten, -schlingen, -haken oder Zeckenkarten zur Verfügung. Ob die Zecken durch gerades Herausziehen oder durch Drehen entfernt werden sollen, ist Gegenstand kontroverser Diskussion (TEECE & CRAWFORD, 2002). Während Needham *et al.* empfehlen, die Zecken mit einer geschwungenen Zange so nah an der Haut wie möglich zu greifen und dann mit einem konstanten Zug herauszuziehen (NEEDHAM, 1985), hat sich in einer Versuchsreihe mit Tierärzten und Besitzern das Herausdrehen der Zecken mit einem V-förmigen Hilfsmittel als Methode der Wahl etabliert (DUSCHER *et al.*, 2012). Diese Variante verlangte kaum Kraftaufwand, der Widerstand der Tiere war gering und konnte durch die Besitzer zügig und effizient durchgeführt werden. Für alle Methoden gilt jedoch, dass die Zecken vollständig entfernt werden müssen und möglichst keine Teile, in erster Linie die Mundwerkzeuge, in der Haut des Patienten verbleiben sollen. Diese können zur Bildung einer erythematösen, knotenartigen Hautveränderung führen, da die verbliebenen Fragmente eine Fremdkörperreaktion in der Haut auszulösen vermögen (HADDAD *et al.*, 2018). Des Weiteren muss darauf geachtet werden, dass die Zecke von der entfernenden Person nicht zerdrückt wird. Hier besteht die Gefahr, dass es durch den Kontakt mit infektiösem Material aus den Speicheldrüsen der Zecke und Wunden auf der Haut der entfernenden Person zu einer Übertragung von Pathogenen kommen kann (DAY, 2011). Nach der erfolgreichen Entfernung sollte die Stelle des Zeckenstiches gesäubert und desinfiziert werden (GAMMONS & SALAM, 2002).

3.2 Repellentien und Ektoparasitika

Für eine Wirkstoff-basierte Ektoparasiten-Kontrolle stehen verschiedene Präparate zur topischen als auch oralen Applikation zur Verfügung. Die Wahl des angewandten Mittels sollte in Absprache mit dem Tierarzt oder der Tierärztin im Hinblick auf die Gewohnheiten und mögliche anamnestische Besonderheiten sowie etwaige Auslandsaufenthalte des Hundes getroffen werden. In jedem Fall müssen die Angaben der Hersteller bezüglich der Kontraindikationen und Anwendungshinweise beachtet werden.

3.2.1 Topische Formulierung von Antiparasitika

In der Regel besitzen Präparate, die lokal angewandt werden, einen repellierenden Effekt. Die Wirkstoffe verteilen sich über das Haarkleid und die Haut, sodass Zecken und weitere Ektoparasiten vom Körper des Hundes abgehalten oder bei Kontakt schnell abgestoßen oder abgetötet werden. Durch diesen Mechanismus erhält die Zecke keine Möglichkeit zu einer längeren Blutmahlzeit und kann so keine pathogenen Erreger, wie z.B. Borrelien, auf den Wirt übertragen (DANTAS-TORRES *et al.*, 2013; SCHORDERET-WEBER *et al.*, 2017). Diese Möglichkeit der Prophylaxe kann in Form eines Halsbandes, einer Spot-on-Formulierung zum Auftragen auf die Haut oder eines Sprays angewandt werden (POSTAL *et al.*, 1995; TAHIR *et al.*, 2021; HUGGINS *et al.*, 2022). In den meisten Fällen wirken die Präparate durch ihre Wirkstoffe oder deren Kombinationen auch auf weitere Ektoparasiten wie Flöhe, Mücken, Läuse oder Haarlinge repellierend oder abtötend. Sie können somit auch Schutz vor anderen, Vektor-übertragenen Krankheiten außer der LB, wie Anaplasiose (KRAMER *et al.*, 2020), Ehrlichiose (STANNECK & FOURIE, 2013), Babesiose (FOURIE *et al.*, 2013a) oder Leishmaniose (ALVES *et al.*, 2022) bieten. Im Fall von Wirkstoffkombinationen werden durch die synergistischen Wirkweisen der verschiedenen Stoffe aufeinander die toxischen Effekte auf Insekten und Spinnentiere erhöht (STANNECK *et al.*, 2012). Eine häufig verwendete Stoffgruppe ist die der Pyrethroide, zu welcher die lipophilen Wirkstoffe Permethrin, Flumethrin und Deltamethrin gehören (SETHI *et al.*, 2019). Durch eine passive Penetration der Wirkstoffe kommt es zu einer Verteilung im Körper des Parasiten. Der neurotoxische Effekt wird durch die Bindung an die Natrium-Kanäle der Nervenzellmembranen ausgelöst, wodurch es zu einer verlängerten Öffnung, beziehungsweise zu einer verzögerten Schließung dieser kommt. Die resultierenden repetitiven Entladungen der Zellmembran führen zu einer initialen Übererregung mit

Konvulsionen, anschließend zur Lähmung und schließlich zum Tod der Arthropoden (ZERBA, 1988; DE WEILLE & LEINDERS, 1989; NARAHASHI, 1996; ZLOTKIN, 1999). Was allen Stoffen dieser Gruppe gemein ist, ist die ausgesprochen hohe, toxische Selektivität für Arthropoden und die nur niedrige Toxizität für Säugetiere (TAMAGNO *et al.*, 2022). Katzen allerdings besitzen nur eine verminderte Aktivität des Enzyms Glucuronyltransferase, welches für die Verstoffwechslung von Pyrethroiden verantwortlich ist (MARTIN & CAMPBELL, 2000). Werden sie dennoch mit Präparaten behandelt, die Pyrethroid-basierte Stoffe enthalten, kann es zu hochgradig toxischen Erscheinungen bis hin zum Tod kommen (BOLAND & ANGLES, 2010). Phenylpyrazole wie Fipronil können mit Pyrethroiden kombiniert oder als Einzelwirkstoff angewandt werden (ENDRIS *et al.*, 2002). Es wirkt durch die Bindung an Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren, was zu deren Inhibierung führt (TINGLE *et al.*, 2003). Infolgedessen kommt es zu einer Hemmung des Chlorid-Ionen-Einstroms an GABA-regulierten Chloridkanälen und schließlich zu Hyperexzitationen und Tod der Parasiten (BLOOMQUIST, 1996; HAINZL & CASIDA, 1996). Auch bei diesem Wirkstoff besteht eine hohe Affinität und Selektivität zu den Rezeptoren von Wirbellosen (KUHR & MOTOYAMA, 1998). Weitere, häufig eingesetzte Wirkstoffgruppen in Präparaten zur Kontrolle von Endo- und Ektoparasiten sind makrozyklische Laktone, Neonicotinoide oder Juvenilhormon-Analoga (MCCALL *et al.*, 2017).

3.2.2 Orale Formulierung von Antiparasitika

Die Isoxazoline sind eine tierarzneimittelhistorisch junge Wirkstoffgruppe, deren Vertreter wie Afoxolaner, Fluralaner, Lotilaner und Sarolaner seit einigen Jahren in Form von Kautabletten kommerziell erhältlich sind (ZHOU *et al.*, 2022). Das Wirkungsspektrum dieser systemischen Ektoparasitika erstreckt sich sowohl über die Abtötung von Zecken und Flöhen, also eine akarizide und insektizide Wirkung, als auch über die Behandlung von Krankheitsbildern hervorgerufen durch Milben, wie der Sarkoptesräude und Demodikose (ROHDICH *et al.*, 2014; FOURIE *et al.*, 2015; BECSKEI *et al.*, 2016b; SIX *et al.*, 2016b). Nach der oralen Gabe und der Resorption aus dem Darm kommt es zu einer systemischen Verteilung der Wirkstoffe im Organismus des Hundes durch die Bindung an Plasmaproteine. Maximale Plasmakonzentrationen werden bereits nach 24 Stunden erreicht (KILP *et al.*, 2014). Damit Zecken den Wirkstoff aufnehmen, muss es zu einer Blutmahlzeit am behandelten Wirt kommen (BEUGNET *et al.*, 2014; JONGEJAN *et al.*, 2016). Die toxische Wirkweise besteht in einer Blockade von GABA- und Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanälen der Parasiten (OZOE *et al.*, 2010). Der GABA-mediierte Einstrom von Chlorid-Ionen in die Zellen bedingt eine Hyperpolarisation der Zellmembran, was wiederum zu inhibitorischen, postsynaptischen Potenzialen führt, welche die Auslösung von Aktionspotenzialen erschweren (MACDONALD & OLSEN, 1994; HEVERS & LÜDDENS, 1998). Diese Rezeptoren besitzen Wirbellose nicht nur im ZNS, sondern auch im PNS, wo sie zur Muskelrelaxation führen (LUMMIS, 1990; RAUH *et al.*, 1990). Die Glutamat-gesteuerten Ionen-Kanäle werden ebenfalls von dieser Wirkstoffgruppe selektiv beeinflusst, wenn auch in geringerem Umfang als von makrozyklischen Laktonen (GASSEL *et al.*, 2014). Durch die Isoxazoline wird also der Einstrom von Chlorid-Ionen durch die GABA- und Glutamat-gesteuerten Ionen-Kanäle blockiert, was in Hyperexzitationen mit anschließender spastischer Lähmung und schließlich dem Tod der Parasiten resultiert (OZOE *et al.*, 2010; GASSEL *et al.*, 2014). Dieser tritt innerhalb von 8 bis 24 Stunden nach Beginn des Saugaktes durch die Zecke ein (BECSKEI *et al.*, 2016a; SIX *et al.*, 2016a).

3.3 Immunisierung durch Impfung gegen die Lyme-Borreliose

In den 1990er Jahren war in den USA ein OspA-basierter Impfstoff gegen LB für Menschen erhältlich. Die Effizienz betrug über 76 % (STEERE *et al.*, 1998), und dennoch wurde er im Jahr 2002 vom Hersteller aufgrund fehlender Akzeptanz und Nachfrage vom Markt genommen (HANSON & EDELMAN, 2003; POLAND, 2011). Zwar gibt es in der Humanmedizin gegenwärtig keine Möglichkeit der Immunisierung durch Impfung, doch ist der Bedarf aufgrund der steigenden Risikofaktoren und Fallzahlen durchaus gegeben. Aktuell befindet sich ein OspA-basierter Impfstoff-Kandidat in Phase III klinischer Studien in den USA sowie Europa (PFIZER INC., 2022). Für Hunde jedoch stellt die Impfung eine der drei Säulen in der Prävention vor Infektion und Erkrankung mit LB dar (CAMIRE *et al.*, 2021). Im Jahr 2022 stehen in Deutschland für die Immunisierung von Hunden gegen LB drei zugelassene Impfstoffe zur Verfügung (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2022).

3.3.1 Immunmechanismus der Impfung

Der Schutzmechanismus der Impfung basiert auf der Bildung von Antikörpern, welche gegen das OspA von *Bbsl* gerichtet sind (COMSTEDT *et al.*, 2015). In Deutschland sind hierzu Lysat-Impfstoffe erhältlich, welche inaktivierte Borrelien enthalten, die das OspA auf ihrer Oberfläche tragen. Auf dem US-amerikanischen Markt sind auch Impfstoffe erhältlich, die rekombinantes OspA als Antigen enthalten. Nach der Impfung wird das Immunsystem des Hundes zur Bildung von Antikörpern gegen dieses Oberflächenprotein angeregt. OspA ist ein Lipoprotein, welches den Borrelien die spezifische Bindung an Proteine im Mitteldarm der Zecke ermöglicht und somit eine Adhäsionsfunktion hat (PAL *et al.*, 2000; FINGERLE *et al.*, 2002). Während der Blutmahlzeit der Zecke kommt es zu einer Variation der Oberflächenstruktur der Borrelien und somit zu einer vermehrten Expression von OspC, welches vermutlich an der Wanderung der Spirochäten zur Speicheldrüse beteiligt ist (PAL *et al.*, 2000; PAL *et al.*, 2004b). Saugt eine mit *Bbsl* infizierte Zecke an einem durch Impfung immunisierten Wirt, so kommt es durch die Blutmahlzeit zur Aufnahme von impfinduzierten Antikörpern gegen OspA. Diese binden schon im Mitteldarm der Zecken an das von den Borrelien exprimierte Oberflächenprotein und verhindern so die Übertragung in den Wirt (GIPSON & DE SILVA, 2005). In Experimenten, bei denen Mäuse mit sehr hohen Konzentrationen an OspA immunisiert wurden, wurden die Bakterien innerhalb der Zecke abgetötet

und die Übertragung verhindert (FIKRIG *et al.*, 1992; RATHINAVELU *et al.*, 2003). Zirkulierten nur geringe Konzentrationen an OspA-Antikörpern in den Mäusen, so wurde die Übertragung zwar auch geblockt, dennoch konnten lebende Spirochäten im Mitteldarm, aber nicht in den Speicheldrüsen nachgewiesen werden. Die genauen Mechanismen dieser vermuteten Immobilisierung sind noch nicht bekannt (DE SILVA *et al.*, 1999; GIPSON & DE SILVA, 2005). Dieser Mechanismus, bei welchem die Impfung ganz gezielt auf bestimmte Proteine der pathogenen Erreger abzielt und eine Übertragung der Pathogene auf den Wirt verhindert wird, ist im englischsprachigen Raum unter dem Stichwort *transmission-blocking vaccination* bekannt (DE SILVA *et al.*, 1996; CHOWDHURY *et al.*, 2009; MAITRE *et al.*, 2022). Somit schützt die Immunisierung durch Impfung den Wirt, indem schon die Infektion mit den Erregern der LB selbst verhindert wird (FIKRIG *et al.*, 1992; STRAUBINGER *et al.*, 1995; CONLON *et al.*, 2000; GIPSON & DE SILVA, 2005). Das OspA der verschiedenen Borrelien-Spezies unterliegt einer speziesspezifischen Variabilität. Um einen möglichst umfassenden Schutz vor LB zu erzielen, bedarf es also aufgrund der Vielzahl der Spezies eine Kreuzreaktivität zwischen diesen (RUZIĆ-SABLJIĆ *et al.*, 2002; MARGOS *et al.*, 2009). In Studien wurde allerdings gezeigt, dass diese nur in geringem Maß vorhanden ist. Der Schutz vor Infektion mit einer heterologen Spezies ist somit durch OspA aus einer einzelnen Borrelien-Spezies als Antigen nicht gewährleistet (GERN *et al.*, 1997; TOPFER & STRAUBINGER, 2006). Impfstoffe sollten daher eine möglichst hohe Anzahl der Spezies als Antigene enthalten, die im Rahmen der Gegebenheiten verantwortlich für LB sind. Des Weiteren kommt es bei diesem OspA-basierten Impfmechanismus zu keiner natürlichen Auffrischung des Schutzes durch Erregerkontakt im Wirt, da die Borrelien schon in der Zecke inaktiviert werden. Das Immunsystem des Wirtes erfährt daher keine Anregung zu einer kontinuierlichen Bildung von Antikörpern. Zudem findet ein natürlicher Abbau von impfinduzierten Antikörpern statt, sodass ohne regelmäßige und erfolgreiche Wiederholung der Immunisierung eine Aufrechterhaltung des Schutzes in Form von einer ausreichenden Menge an gebildeten Antikörpern nicht möglich ist (BARTHOLD *et al.*, 1996; GOLDE *et al.*, 1997).

3.3.2 Impfstoffe

Die Erreger der LB als auch ihre Vektoren unterscheiden sich in ihrem geographischen Vorkommen zwischen den Kontinenten (BRANDA & STEERE, 2021). Somit muss sich die Wahl des Impfstoffes bzw. der darin verwendeten Antigene an den vorliegenden Gegebenheiten orientieren. Spezifische Vakzine gegen die LB können also nicht pauschalisiert weltweit eingesetzt werden (GERN *et al.*, 1997; CHOMEL, 2015). Die Impfstoffe können entweder als LySAT inaktivierte Vollerreger enthalten oder aber es wird rekombinantes OspA als Antigen eingesetzt. Diese auf rekombinantes OspA basierenden Impfstoffe für Hunde sind auf dem US-amerikanischen Markt erhältlich, wie z.B. Recombitek Lyme (CONLON *et al.*, 2000). Das Wirkprinzip der in Deutschland erhältlichen Vakzine beruht auf der Induktion von spezifischen Antikörpern gegen das OspA der im Impfstoff enthaltenen, inaktivierten Borrelien. Nach erfolgreicher Übertragung auf einen Wirt und dessen Infektion entfernen die Borrelien das OspA von ihrer Oberfläche, daher eignet sich die Impfung nicht als Therapie während einer bestehenden Infektion (ZHONG *et al.*, 1997). Bei allen im Jahr 2022 in Deutschland zugelassenen Impfstoffen handelt es sich um inaktivierte Vakzine. Sie enthalten inaktivierte Vollerreger, unterscheiden sich aber in ihrer Spezies-Zusammensetzung.

Tabelle 3: Übersicht über die im Jahr 2022 zugelassenen Impfstoffe in Deutschland, modifiziert nach Paul-Ehrlich-Institut (PAUL-EHRLICH-INSTITUT, 2022)

Impfstoff	Zulassungsinhaber	Borrelien-Spezies	Erstzulassung
Merilym 3	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH	<i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> <i>Bbss</i>	01.03.2013
Virbagen canis B	Virbac Tierarzneimittel GmbH	<i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i>	07.10.2009
RIVAC Borrelia	Ecuphar N.V.	<i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i>	21.09.2009

Der für diese retrospektive Studie angewandte Impfstoff Merilym 3 der Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH (Deutschland) ist somit der einzig verfügbare Impfstoff in Deutschland, der Schutz vor Infektion mit drei Erregerspezies bietet. Die Zulassung durch das Paul-Ehrlich-Institut erfolgte am 01.03.2013 (Zul.-Nr. PEI.V.11652.01.1). Aluminiumhydroxid fungiert als Adjuvans. Die Injektion einer Dosis (1 ml) Merilym 3 erfolgt subkutan und ist ab einem Alter von zwölf Wochen möglich. Vor der Verabreichung muss der Lysatimpfstoff geschüttelt werden, um eine homogene Suspension herzustellen. Mögliche Nebenwirkungen, welche vom Zulassungsinhaber aufgeführt werden, sind vorübergehende Schwellungen an der Injektionsstelle, Inappetenz, Lethargie sowie eine vorübergehende Erhöhung der Körpertemperatur von bis zu 1,5 °C. Für die Grundimmunisierung wird Merilym 3 zwei Mal im Abstand von drei Wochen verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Immunität werden jährliche Wiederholungsimpfungen, möglichst vor Beginn des Anstiegs der Zeckenaktivität im Frühjahr, empfohlen. Dieses Impfschema unterscheidet sich von den Empfehlungen für die anderen beiden verfügbaren Impfstoffe. Virbagen canis B und Rivac Borrelia werden zwar ebenfalls zwei Mal im Abstand von 14-21 Tagen grundimmunisiert, doch der Hersteller empfiehlt vier bis sechs Monate nach der Grundimmunisierung die erste Wiederholungsimpfung, an welche sich wiederum nach vier bis sechs Monaten die zweite Wiederholung anschließt. Ab dem dritten Jahr erfolgt die Immunisierung jährlich vor der Zeckensaison. Da der Impfschutz in direktem Zusammenhang mit der Höhe des spezifischen Antikörper-Niveaus steht, kann eine ausreichende Protektion nur durch regelmäßige Immunisierung erlangt werden (GOLDE *et al.*, 1997; NOWLING & PHILIPP, 1999) und ist somit abhängig vom empfohlenen Impfschema. In humanmedizinischen Studien konnte gezeigt werden, dass nach zweimaliger Impfung 68 % der Probanden einen Schutz vor Infektion aufgewiesen haben, sich die Zahl nach der dritten Immunisierung nach zwölf Monaten jedoch auf 92 % erhöht hat (SIGAL *et al.*, 1998). Wurde sechs Monate nach der Grundimmunisierung eine zusätzlich Booster-Impfung verabreicht, kam es zu einem signifikanten Anstieg der protektiven Antikörper (VAN HOECKE *et al.*, 1999). Ähnliches wurde von Knödelseder *et al.* in einer Impfstudie mit Pferden nachgewiesen. Die zweimalige Immunisierung führte zwar zu hohen spezifischen Gesamtantikörperspiegeln, diese fielen aber nach fünf Monaten schon deutlich ab und waren nur noch in geringer Höhe nachzuweisen. Eine dritte Impfung nach sechs Monaten hingegen konnte das Antikörperniveau signifikant anheben, und dieser Anstieg konnte auch in den Folgemonaten der

Studie weiter beobachtet werden (KNÖDLSEDER *et al.*, 2019). Um auch für den Impfstoff Merilym 3 eine Impfempfehlung abgeben zu können, muss die humorale Immunantwort, welche durch die Immunisierung hervorgerufen wird, charakterisiert und die Ergebnisse verschiedener Impfschemata miteinander verglichen werden.

III. PUBLIKATION



Article

A Retrospective Study with a Commercial Vaccine against Lyme Borreliosis in Dogs Using Two Different Vaccination Schedules: Characterization of the Humoral Immune Response

Claudia K. Wilczek, Jasmin Wenderlein , Stephanie Hiereth and Reinhard K. Straubinger

Chair of Bacteriology and Mycology, Institute of Infectious Diseases and Zoonosis, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich, Veterinärstr. 13, 80539 Munich, Germany

* Correspondence: R.Straubinger@lmu.de

Abstract: Lyme borreliosis, a multisystemic disease caused by spirochetes of the genus *Borrelia*, is the most common tick-borne disease in the northern hemisphere. Differently from human medicine, several vaccines are available for dogs. To provide the best protection possible, vaccination schemes should be adapted regularly to meet the needs resulting from an increased tick exposure risk due to an inescapable climate change. In this retrospective study, a total of 183 vaccinations were performed with a commercial, multivalent vaccine against Lyme borreliosis, and vaccinated dogs were monitored over an observation period of 13 months. Dogs were either vaccinated on days 0 and 21 and a booster on day 365 (standard vaccination schedule), or with an additional booster vaccination on day 180. Canine serum samples were then tested for their borrelia-specific antibody levels using a two-tiered test system consisting of a kinetic ELISA followed by a line immunoassay. Dogs vaccinated with the standard vaccination schedule displayed decreasing antibody levels between days 120 and 360, which is probably insufficient to prevent an infection with borreliae. In contrast, the additional booster vaccination received on day 180 intercepts this decline in antibody levels between days 225 and 360, providing a sufficient immunity to prevent infection. The results from this retrospective study allow us to recommend a basic vaccination schedule with an additional booster vaccination on day 180 to ensure the best possible protection for dogs against Lyme borreliosis.

Keywords: Lyme borreliosis; *Borrelia burgdorferi* sensu stricto; *Borrelia garinii*; *Borrelia afzelii*; vaccination; OspA; vaccination scheme; booster; *Ixodes ricinus*



Citation: Wilczek, C.K.; Wenderlein, J.; Hiereth, S.; Straubinger, R.K. A Retrospective Study with a Commercial Vaccine against Lyme Borreliosis in Dogs Using Two Different Vaccination Schedules: Characterization of the Humoral Immune Response. *Vaccines* **2023**, *11*, 43. <https://doi.org/10.3390/vaccines11010043>

Academic Editor: Pedro Plans-Rubió

Received: 2 December 2022

Revised: 21 December 2022

Accepted: 22 December 2022

Published: 25 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ixodes ricinus is the most common tick species in Europe feeding on mammals (e.g., mice, rabbits, dogs, cats, deer, humans) and birds [1]. Beside bacteria from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl*) complex causing Lyme borreliosis (LB), *I. ricinus* ticks transmit pathogens like *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., and tick-borne encephalitis virus. LB is the most common tick-borne disease (TBD) in the northern hemisphere [2] displaying high geographical differences in its species distribution between the continents. The most important species in Europe are *B. afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*) [3].

The ticks' questing activity is dependent on the temperature. Ticks start questing at a temperature of at least 7 °C [4,5]. Due to climate change and an estimated temperature increase of 0.9–2.3 °C by 2100—when climate policy is as ambitious in its actions as pledged by politicians [6]—we must assume, that tick reproduction and activity will increase over time, and ticks will populate habitats that they could not inhabit until recently, e.g., higher altitudes [7,8] or regions closer to the arctic circle [9]. For Sweden, a connection between an increase in TBD and climate change has already been discovered in 2001 [10]. Here, an increase in TBD incidence was associated with mild winters, temperatures favoring spring development, long autumns in the previous year, temperatures favorable for ticks' questing activity early in the year, and a deeper snow cover [1,10]. In 2007, tick activity in

the winter associated with host quest has been described for the first time in Germany [11]. Therefore, dog owners must be aware of the year-round risk of tick attachment and TBD transmission. However, unlike in humans LB in dogs shows no obvious early clinical signs such as an *erythema migrans* or flu-like signs [12,13]. Nevertheless, it has been shown, that experimentally infected dogs develop clinical signs consistent with polyarthritis like joint pain, lethargy, transient fever, anorexia, and neurological alterations [12,14,15]. In Germany, the seroprevalence in dogs for *Bbsl* ranges between around 2 and 20% [16,17], though, not every infected dog displays any or noticeable clinical signs [18–20]. Due to the lack of early and specific clinical signs, the detection of LB is not trivial. As the cultivation and detection of *Borrelia* spp. in tissue samples or body fluids is difficult [14,21], LB is diagnosed by serologic testing via a two-tiered test consisting of a kinetic antibody ELISA (KELA) and a line immunoassay (LIA) [14,22]. However, seropositivity is not evident for LB and the diagnosis should be based on known tick exposure in an endemic region, compatible clinical signs, and laboratory findings.

The prevention of LB is based on three columns: tick removal [23], application of repellents [24] or ectoparasiticides [25], and vaccination [26]. Since many decades, vaccinations are playing an important role in protecting humans and animals against diseases, and vaccination of dogs against LB will become an even more important tool for LB prevention as more ticks develop resistance against acaricides [27].

Currently, in Germany the vaccination of dogs against LB is based on immunization with lysate vaccines containing a special lipoprotein known as outer surface protein A (OspA) [28]. This antigen enables the vaccinees to produce antibodies against OspA. Interestingly, OspA is expressed only by *Bbsl* organisms in the tick and in vitro cultures [29–31]. During the ticks' blood meal, the mammalian blood with antibodies against the OspA will be sucked into the ticks' intestine where the OspA on the spirochetes' surface will bind the antibodies. In turn, the bound antibodies immobilize the spirochetes and prevent the infection of the mammalian host [29,32]. In the 1990s, a LB vaccine with the OspA for the vaccination of humans with an efficiency of 76% was introduced in the US market. However, low public demand and acceptance directed the manufacturers to remove this vaccine from the market in 2002 [33–35]. Meanwhile, there is an increasing interest to introduce again a human LB vaccine since clinical trials are conducted (NCT05477524). In 2022, three vaccines against LB for dogs targeting different species of the *Bbsl*-complex are authorized for use in Germany. The choice of borrelial species or antigens present in the vaccine should be adapted to the geographical diversity of the *Borrelia* spp. prevailing in the region, where the vaccine will be used [36,37], resulting in the notion that a specific LB vaccine cannot be used worldwide. As described above, vaccines applied in Germany should protect against *Bbss*, *B. garinii*, and *B. afzelii*.

Protection against disease and—more desirable—against infection is not only affected by the antigens present in the vaccine but is highly dependent on the vaccination schedule applied. In the case of LB most veterinarians adhere to a simple scheme based on a basic immunization consisting of two initial injections two to three weeks apart followed by yearly revaccinations. Yet, thorough analyses of antibody levels in humans after basic vaccination have shown, that protective antibody levels wane rapidly, and protection is lost within six months after vaccination was started [38]. This might be the case in dogs as well [17], however, the vaccine used in this study has not been tested previously. The vaccination schedule with a booster vaccination after six months seems reasonable, as there is evidence also in horses [39] that an additional booster vaccination after six months is advisable as antibodies against OspA seem to gradually lower after time, resulting in a possible gap in immunity [17,39,40]. As shown in a study in dogs using vaccines protecting against one or two *Bbsl*-complex species, a booster vaccination a few weeks after the basic immunization increased antibody levels [17]. However, vaccines protecting against a single or two *Bbsl*-complex species display no or at best a low protective effect against other borrelial species [17]. To the best of our knowledge, the effect on the humoral IgG OspA response in association with the vaccination schedule of a lysate LB vaccine for

dogs using three *Bb*sl-complex species has not been analysed. Therefore, this study aimed to characterize and compare IgG antibody levels arising from two different vaccination schedules using a polyvalent vaccine (Merilym 3, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany). For this purpose, dogs' IgG antibody levels were assessed quantitatively and semi-quantitatively using the two-tiered-test consisting of a KELA and a LIA. Further, a species-specific rOspA KELA was performed to measure the dogs' immune response against *Bb*ss, *B. garinii*, and *B. afzelii*.

2. Materials and Methods

The ethic commission of the veterinary faculty of the LMU Munich approved the use of canine serum samples in the proposed study (reference number 327-20-09-2022).

The study was conducted in a veterinary practice in Amberg (Upper Palatinate, Bavaria, Germany) receiving dog patients from the city of Amberg with a low LB risk of 23.75 reported human cases (RHC) per 100,000 inhabitants (I), the district Amberg-Sulzbach with a medium-high LB risk of 201.95 RHC per 100,000 I, and the districts Schwandorf (292.48 RHC/100,000 I), and Neumarkt in der Oberpfalz (125.14 RHC/100,000 I) [41]. Due to the medium-high risk of human LB in the districts of Amberg-Sulzbach, Schwandorf, and Neumarkt in der Oberpfalz and many cases of tick attachment to dogs leading to anaplasmosis and LB in the region of this veterinary practice, many dog owners are willing to vaccinate their companion animals against LB, resulting in a high vaccination rate in this district. Therefore, this practice was especially suited to study the effectiveness of vaccination schedules retrospectively in an animal-experiment-free setting.

Owners asking for a LB vaccination in the practice were given the choice to either vaccinate their dogs with the standard vaccination (i.e., vaccination on days 0, 21, and 365) or to vaccinate with an additional booster (i.e., vaccination days 0, 21, 180, and 365). All dogs were tested before the first vaccination for antibodies specific to LB infection with the commercially available SNAP 4Dx Plus test (IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA) conducted according to the manufacturer's instructions to rule out an active infection at the time of vaccination (i.e., day 0). An active infection would have made the treatment of dogs with antibiotics necessary before vaccination. The immunization of dogs who were tested negative in the SNAP 4Dx Plus test was then conducted using the vaccine Merilym 3 (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany), which was approved for its use in dogs in March 2013 by the Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Lagen, Germany (PEI.V.11652.01.1). A 1.0-mL dose of this lysate vaccine contains the inactivated *Bb*sl-complex species *B. garinii*, *B. afzelii*, and *Bb*ss. As a preservative, 0.5 mg of formaldehyde are incorporated, and aluminum hydroxide serves as an adjuvant. The vaccination of the dogs was performed subcutaneously in the dorsolateral thoracic region using 24-gauge needles (0.55 mm × 25 mm; B. Braun SE, Melsungen, Germany).

When blood from the vaccinated dogs was collected for diagnostic purposes in the veterinary practice and leftovers were available, these leftover blood samples were stored upright at room temperature for 60 to 180 min until complete coagulation. Samples were then centrifuged at 4000 × *g* for ten minutes. Afterward, the serum was transferred into screw cap microtubes (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany), which were labeled and stored at −20 °C until serological analysis. Blood was collected by either puncturing the right *Vena cephalica antebrachii* or the right *V. saphena lateralis* with a 20-gauge needle (0.90 mm × 40 mm; B. Braun SE) and 9-mL Serum-Monovettes Z-Gel (Sarstedt AG & Co. KG). All owners of vaccinated dogs whose blood was collected for diagnostic purposes and residuals were available for LB antibody testing agreed to the transmission and serologic analysis of their dogs' blood at the Chair of Bacteriology and Mycology of LMU Munich. Serum samples were assigned to nine different periods according to the time that passed between the first vaccination and the sampling for diagnostic purposes. Following one year after vaccination, we divided the observation period into nine time frames and accordingly assigned them to nine descriptive time points (Table 1).

Table 1. Allocation of time frames in the observational period in days and categorization to descriptive time points used in the further analysis.

Time Frame (Days)	Time Points	Available Serum Samples from V-basic	Available Serum Samples from V-plus
0	t0	28	26
25–50	t30	27	26
51–80	t60	27	26
100–135	t120	27	26
155–180	t180	25	26
185–265	t230	23	24
270–325	t300	22	24
325–369	t350	22	23
370–560	t390	21	22

V-basic, vaccinated on days t0, t30, and t350; V-plus, vaccinated on days t0, t30, t180, and t350.

At the end of the observation period, all serum samples were tested at the Chair of Bacteriology and Mycology of LMU Munich. Serum samples were therefore thawed at room temperature. For quantitative analysis, total antibody levels specific for LB organisms were evaluated using a KELA as described elsewhere [12,17,38]. Representative samples for every time point from each study group, of which a sufficient volume was available after the first round of serological testing, were assessed for the presence of species-specific rOspA antibodies using a KELA. As the lowest number of serum samples available for one observation timepoint was seven serum samples, we used this number of samples in all KELAs to allow compatibility. Therefore, 96-well-plates were prepared with 1.0 µg of purified recombinant OspA from the strains *Bbss ZS7*, *B. garinii ZQ1*, or *B. afzelii PKo* kindly provided by Prof. Dr. Kraiczy (Institute for Medical Microbiology and Infection Control, Frankfurt, Germany). To confirm positive results and differentiate infected from vaccinated dogs, a line immunoassay (LIA) was performed. Here, the *Borrelia Veterinär plus OspA LINE* (VIROTECH Diagnostics GmbH, Dietzenbach, Germany) was used to analyze and evaluate the presence of *B. burgdorferi* sensu lato-specific antibodies according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Antibody levels for each dog were recorded, summarized according to the experimental groups, and compared statistically. KELA curves were visualized using OriginPro, Version 2022 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). To compare the KELA levels (i.e., IgG and species-specific) from both groups, we calculated the area under the curve (AUC) between the time points t0 and t30, t30 and t60, t60 and t120, t120 and t180, t180 and t230, t230 and t300, t300 and t350, and t350 and t390. The AUC was then tested for standard deviation using the Shapiro–Wilk test. Besides the AUC between t0 and t30, all AUCs were normally distributed. Significance for the AUC between t0 and t30 was then calculated using the Mann–Whitney test, while all other time frames were tested with the *t*-test. All analyses were conducted with OriginPro, Version 2022 (OriginLab Corporation). Significance was assumed when the *p* value was $p \leq 0.05$.

3. Results

In total, 183 vaccinations against LB were performed during the project. Of these vaccinations for V-basic, 222 serum samples were analyzed for the classified time points, while for V-plus 223 serum samples were collected and examined for their antibody contents. Of these serum samples, 41% originated from female dogs, while the remaining 59% were from male dogs, 39% of the experimentees were spayed or neutered. The age of the dogs ranged between four months and eleven years. Irrespective of the vaccination group, only moderate side effects were reported. In the test population, 4% of the dogs seemed to be tired one or two days after the immunization, 2% showed signs of moderate pain, and

in 0.6% moderate swelling at the injection site was reported. Serum samples displayed negative results in the SNAP 4Dx Plus before the vaccination on t0. However, when analyzing these sera from t0 with a KELA, some of these sera showed antibody levels higher than 100 ($n = 10$), which is thought to be a threshold that non-infected dogs rarely pass. When analyzing these serum samples on a LIA, a color reaction specific to infection was observed in four serum samples. Sera, which tested negative on the SNAP-test and showed antibody levels below 100 KELA units, displayed a slight color- reaction for the VlsE antigen (VlsE AG line) fainter than the cut-off control (COC) or no reaction at all on the LIA strip (Figure 1B). This is considered negative for LB infection.

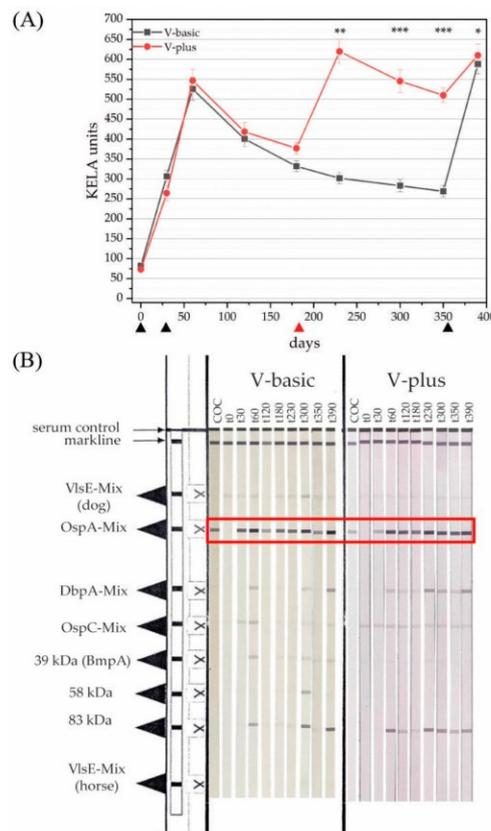


Figure 1. (A) *Borrelia burgdorferi* sensu lato-specific antibody levels in dog sera detected by KELA throughout the complete observation period. V-basic (vaccinated on days t0, t30, and t350) displayed as black squares; V-plus (vaccinated on days t0, t30, t180, and t350) shown as red circles. The whiskers depict the standard deviation at a specific time point. Black triangles show vaccination time points in both groups, while the red triangle indicates the additional booster vaccination in V-plus. (B) LIA strips for representative dogs from V-basic (left side) and from V-plus (right side) displaying semi-quantitative antibody reactions throughout the observational period. The first LIA strip shows the COC, which is used to determine the degree of color reaction intensity of each antigen line. Following right are the strips incubated with canine sera representative for two vaccination groups in chronological order from t0 to t390. The vaccination-specific antigen signal on the LIA strips is the OspA-Mix (red box). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

The first vaccination with the vaccine was performed on t0. All samples available on t30 showed increasing antibody levels in the KELA (Figure 1A) and specific reactions to the OspA antigen on the LIA (Figure 1B). Dogs were then vaccinated a second time on t30, finalizing the basic immunization. After the second immunization, antibody levels measured with the KELA increased further until t60. At this time point, LIA strips displayed color reactions to the OspA antigen that were stronger than the COC in both groups. Color reactions of antigens beside the VlsE and stronger than the COC that occurred on the LIA strips of vaccinated canines are considered reactions to the various antigens provided with the lysate vaccine. After t60, both groups displayed a steady and clear decrease in antibody levels observable until t180 (Figure 1A); on matching LIA strips this can be observed as well as decreasing color intensity of the OspA antigen lines (Figure 1B). Dogs in V-plus, which had received an additional booster vaccination on t180, developed significantly higher antibody levels on t230 compared to dogs in V-basic (Figure 1A). The antibodies reached an average of around 600 KELA units in V-plus, compared to an average of around 300 KELA units in V-basic (Figure 1A). On the LIA strips at time point t230, a stronger color reaction to OspA in V-plus was observed compared to V-basic (Figure 1B). While the antibody levels from the KELA decreased further in V-basic until the booster vaccination around t350 was applied, antibodies in dogs of V-plus increased after the additional booster on t180 and stayed at a significantly higher level until the yearly booster vaccination on t350 (Figure 1A). On t350, V-plus reached KELA units over 500, while in V-basic KELA units stayed below 300. The LIA results support the observations made with the KELA. The color reaction for OspA in V-basic was fainter than in V-plus and similar to the COC and was directly proportional to the decreasing antibody levels (Figure 1B). At the last observation time point (t390), antibodies of both groups displayed similar levels in the KELA (V-basic 588 KELA units on average; V-plus 610 KELA units on average; Figure 1A). LIA strips display a very strong signal for OspA in both groups on t390 after the last booster vaccination (Figure 1B).

Reactions to species-specific recombinant OspA (rOspA) originating from the three *Bbsl*-complex species used in the lysate vaccine were subsequently analyzed by applying species-specific rOspA KELA assays (Figure 2). The antibody levels against *Bbss*, *B. garinii*, and *B. afzelii* from both vaccination groups corresponded to the IgG KELA described above (Figure 1A). However, the measured levels for rOspA-specific antibodies for the three different borrelial species were lower than the IgG KELA levels (Figure 1A) for V-basic between t180 and t350. Further, rOspA KELA levels seem to be highly variable between different canine sera used in these assays. *Bbss*-specific rOspA antibody levels in V-basic drop until t180 to a mean KELA level of 166 units and drop further until t350 to a mean KELA level of 86. On t180 mean KELA levels of 140 units were observed for *B. garinii*, that drop to 86 units on t350. Mean KELA levels for *B. afzelii* are at around 179 KELA units on t180 and declined to a mean of 115 KELA units on t350. When applying a booster vaccination on day 180 (i.e., V-plus), a drop in antibody levels until t180 was observed in this group as well. However, the booster vaccination on t180 led to an increase in antibody levels on t230 (Figure 1). This increase led to higher antibody levels until the last booster vaccination on t350.

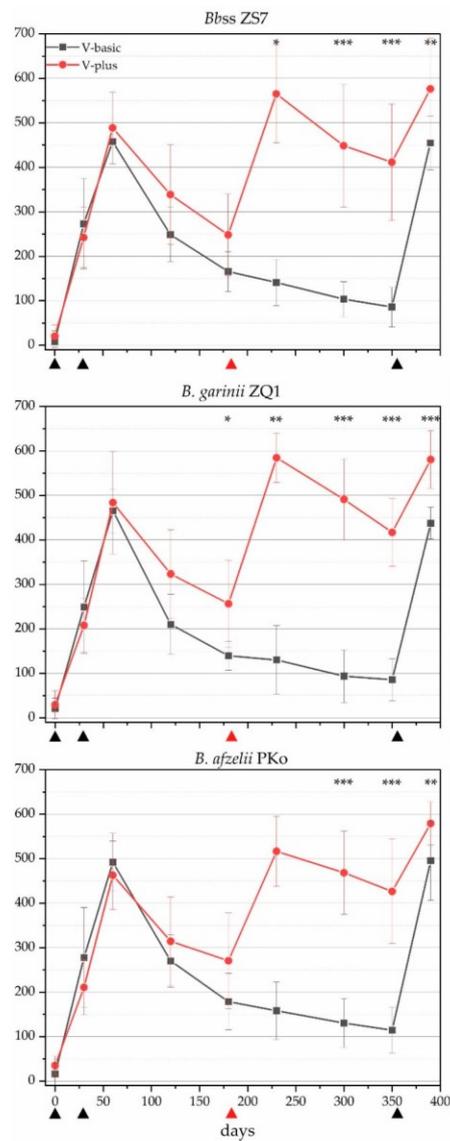


Figure 2. rOspA-specific antibody levels against *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, and *B. afzelii* detected by the species-specific rOspA KELA. V-basic displayed as black squares; V-plus is shown as red circles. The whiskers depict the standard deviation on the specific time point. Vaccination time points are shown as black triangles in both groups; the red triangle indicates the additional booster vaccination in V-plus. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

4. Discussion

Due to climate change and an increase in global temperature, we must expect an increase in tick population and a year-round activity of ticks [10,11,42]. This leads to the conclusion that there is a perennial risk of tick exposure and infection with TBD

such as infections with *Bb*sl causing LB. As described above there are three columns of protection against LB: tick removal, use of repellents and acaricides, and vaccination. Tick removal only protects against LB when dogs are scanned for ticks after every walk and all ticks are found and removed promptly. Acaricides and repellents should be applied individually to the owner's preferences and the dogs' tolerance. All-year-around protection must be provided by reapplying the protective agent routinely. Further, ticks can develop resistance to these repellents and acaricides [27]. The vaccination against LB, based on inactivated *Bb*sl-complex species expressing the OspA provides the most reliable protection against LB, as the vaccination not only protects against the development of disease but further protects against the transmission of *Bb*sl-complex species to the canine host [43]. However, it is crucial to vaccinate against the genospecies that lead to infections in the dogs' geographical environment and to provide perennial protection by keeping antibody levels high enough [44].

In this study, we hypothesized that the vaccination schedule of Merilym 3 (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) as provided by the manufacturer is not sufficient to protect dogs against LB, especially in autumn when a dog is immunized during the spring season. The basic vaccination is recommended to be applied at the beginning of tick season (i.e., spring) followed by a yearly booster vaccination. Other vaccines available in Germany (i.e., Virbagen canis B, Virbac Tierarzneimittel GmbH, Bad Oldesloe, Germany, and Rivac Borrelia, Ecuphar N.V., Oostkamp, Belgium) recommend a further booster vaccination four to six months after the basic immunization [45]. Therefore, we applied the vaccine Merilym 3 according to the vaccination scheme provided by the manufacturer and compared canine antibody levels of dogs receiving the standard vaccination scheme to antibody levels induced by a vaccination scheme with a booster vaccination on t180. Antibody levels were measured with a KELA system and vaccination-specific antibodies were further confirmed with a LIA. As Figure 1 depicts clearly, the standard vaccination scheme (i.e., V-basic) leads to a drop in antibody levels between t180 and t350. This can also be observed by the intensity of the signals on the LIA. When considering the antibody levels observed in the species-specific rOspA KELAs, it becomes very clear, that antibody levels induced with the standard vaccination scheme might not protect against borrelial transmission in autumn. Therefore, we conclude, that the standard vaccination scheme initiated in spring produces a gap in protection against LB in autumn (Figure 3).

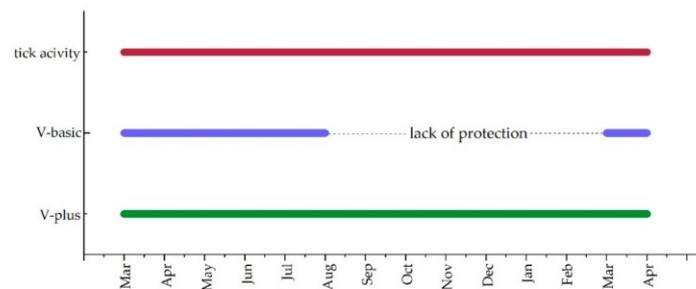


Figure 3. Tick activity and LB protection in different vaccination groups using two vaccination schemes compared over one year when LB vaccination is initiated in spring.

Furthermore, the vaccination scheme with an additional booster on t180 is already recommended for the two other vaccines used in Germany [45]. Considering the decrease in antibody levels between t60 and t180, it might even be too late to apply the booster vaccination on t180 and as described for the other two German vaccines (i.e., Rivac Borrelia and Virbagen canis B) an earlier booster vaccination between days 100 and 150 might even be more adequate. Future research on this issue is urgently needed as well as the characterization of an antibody level protective against infection with borrelial organisms.

The authors would further like to address some general considerations regarding the LB vaccination in dogs. It has recently been discussed that the LB vaccine should still be considered a non-core vaccine in the vaccination guidelines [46] and applied according to the risk assessment of individual patients [45,47]. Therefore, veterinarians and veterinary clinics must be aware of the LB risk and apply individual recommendations regarding the dog's exposure (i.e., working dogs, hunting dogs, traveling). Furthermore, the owners must be made aware of the risks of LB infection and thus must be informed about the importance of rigorous tick scanning after walks and the application of repellents and acaricides. Due to client failure in detecting and removing ticks and continuous application of repellents, adequate protection of canines might not be given and thus LB can occur. A safer method would be the continuous vaccination against LB in endemic regions. However, even when dogs are vaccinated against LB, owners need to keep in mind, that ticks transmit additional infectious agents like *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., which can only be avoided by removing ticks [23] and applying repellents or ectoparasitic agents. As tick-borne encephalitis virus is transmitted within an hour [48], avoiding an infection is only possible by applying repellents. Further, working and hunting dogs that due to their assignments are especially exposed to ticks and tick bites and thus endangered to infection with *Bb*sl-complex species should be protected against LB using every available option especially as their training is expensive and time-consuming and downtime due to LB can easily be avoided. The endemic regions are shifting due to climate change and the ability of ticks to reside in regions that have up to date not been habitable [1]. A further point that must be considered is the increase in tick population due to fewer population losses when winters are milder. Increased temperatures in winter, autumn, and spring further lead to increased activity of ticks in these seasons, which some owners might not be aware of. Additionally, rising global temperature and urban sprawl will increase the population of rodents and small mammals that will, in turn, contribute to the increase of tick populations in these areas [49]. In sum, veterinarians must be informed about such changes and the endemic regions of TBD and inform owners professionally and transparently of the best options for TBD prevention and LB protection, not only in the best interest of the dogs' but also in the interest of the owners' health.

Lately, the opinion has been expressed that the "rationale for canine LB vaccination is unpersuasive" [50] and the experts of the American College of Veterinary Internal Medicine could not agree on a recommendation for a LB vaccine [20]. This matter has further been reasoned with a statement of the American Animal Hospital Association regarding not recommended vaccines [51]. However, this reference refers to not recommended vaccines in pet cats and discusses the use of a vaccination against feline infectious peritonitis. Nevertheless, it is stated, that vaccines are not generally recommended for diseases with a low clinical significance, that display a good response to treatment, and where evidence of vaccination in the field is minimal and adverse events occur frequently [50]. Therefore, the authors feel obligated to address these issues as it affects the reputation of this important vaccine and harms the willingness of veterinarians to recommend and owners to make use of this vaccination. Regarding the low clinical significance, it has been discussed, that 95% of dogs display no clinical signs [50]. This statement first occurred in a study from 1992 by Levy et al. [19]. In this study, 234 dogs were analyzed for *Bb*sl-specific antibodies and according to their reaction divided into a seronegative ($n = 109$) and a seropositive ($n = 125$) group of dogs that were further monitored for 20 months. In both groups, the incidence of limb/joint disorder, lethargy, fever, and inappetence was nearly 5%. Retesting was possible in 202 canines (105 dogs from the seropositive group and 97 dogs from the seronegative group). Some of the examined canines from both groups were treated with antibiotics during the observation period. The observation of seropositive dogs seems incomprehensible, as we do not know when the infection occurred and how long it has been persisting. Regarding the seronegative group that seems sensible to observe, 88 from 97 dogs remained seronegative. Thus, nine dogs have seroconverted, of which two had received antibiotics. The clinical signs these nine dogs displayed are not clear. Further,

the diagnosis of LB was based on the occurrence of limb/joint disorder accompanied by fever, lethargy, and inappetence [19]. As fever has been reported to only peak on single days [52] a co-occurrence would be observed rarely. Returning to the study by Levy et al. (1992) [19], a further sign of LB was the prompt response to antibiotic treatment. However, other bacteria might react to this antibiotic treatment as well, making the exclusion of differential diagnoses crucial. Regardless, differential diagnoses have not been ruled out. Serologic results have not been reported as the actual time of infection was unknown to the author. For animals diagnosed with LB due to clinical signs and prompt reaction to antibiotic treatment neither serologic results nor evidence of borrelial organisms have been reported (i.e., PCR, pathology, or serology) [19]. Therefore, the results from this study must be considered with caution. Nevertheless, this number of dogs displaying no clinical signs has first been cited by Appel et al. (1993) [12] and has in the following years been cited and used various times. However, this number of 5% clinically LB conspicuous dogs in the field is highly questionable and other researchers have provided numbers from clinical studies on dogs that are more reliable. Straubinger et al. (1997) [52] observed severe clinical lameness in 65% of canines experimentally infected and confirmed seropositivity, 10% of seropositive dogs displayed mild lameness, and 25% showed no clinical signs. Of canines that displayed clinical signs, 55% displayed an increase in temperature > 39.4 °C for a single day. In another study, 77% of dogs developed lameness, accompanied in 80% of lame dogs by concurrent fever (≥ 38.0 °C). In 92% of dogs, *Bbss* organisms were recovered from skin and joint tissues samples [22]. In another trial, 69% of dogs developed clinically apparent arthritis after tick exposure [53]. Furthermore, described clinical signs of LB can vary strongly and canines displaying stiffness, lameness, arthritis, and joint swelling [52] are often not recognized and tested for LB. Additionally, further maladies like cardiac signs [54–56], nephritis [57–59], neurologic disorders [15,60], rheumatoid arthritis [61], and myositis [62] have been described to occur in canine patients with LB. It is questionable whether owners can connect these disorders with a tick bite that probably has occurred months before the onset of clinical signs [12,52] and if veterinarians then test dogs with these unspecific clinical signs for LB. Many dogs have been reported displaying no clinical signs [12,22,52], however, the authors wonder if we can recognize mild clinical signs and minimal to moderate pain in canines. In humans it is known that mild to moderate chronic pain affects physical and psychological health [63]. When considering a seroprevalence of around 2 to 20% [16,17], we have to assume that of 10.3 million dogs in Germany in 2021 [64] on average 11% (1,100,000 dogs) are infected with *Bbsl*-complex species. Considering that in animal trials on average 75% of dogs display clinical signs [52], we calculate that around 50% of dogs in the field might display clinical signs. Of the 1,100,000 infected dogs, at least around 550,000 dogs in Germany assumably might display clinical signs and probably experience a reduction in quality of life. Further, one needs to consider that the clinical signs of canines observed in trials have been conducted with *Bbss* only [22,52]. However, other genospecies (i.e., *B. garinii* and *B. afzelii*) might lead to similar or further unrecognized disorders, therefore, research on clinical signs caused by these genospecies is necessary to evaluate the impact of *Bbsl* on dogs. In conclusion, in the authors' opinion LB is no disease with low clinical significance and its well-documented appearance in endemic regions does not support the apprehension against LB vaccination.

Regarding the One Health concern, not only the transmission of antibiotic resistances but also the transmission of disease to humans and further animals must be considered. It has been implied that there is no direct transmission of *Bbsl*-complex species from animal to animal or from animal to human [50]. The authors agree with this statement and the absence of direct transmission has been proven in dogs [52]. However, many indirectly transmitted vector-borne diseases may be further dispersed by our pet animals and increase the risk of vector-exposition for humans. Infected nymphs or uninfected nymphs or larvae that can be infected during the blood meal on a seropositive dog may be carried into human habitats (i.e., urban parks or gardens), where the engorged nymphs then drop off and molt to adult ticks. These adults can then bite humans and thus transmit borrelial species [65]. A

further concern is that vaccination of canines does not reduce LB prevalence [50]. In parts, the authors agree with this statement, as the vaccination of dogs does not influence the sylvatic infectious chain. However, considering that most dogs and humans will not go deep into the woods, and most humans living in cities will conduct their free-time activities in urban parks and greens, the carriage of ticks into these regions displays the greatest danger to the largest human population, townsmen. Therefore, the authors consider an LB vaccination beneficial regarding the One Health concern.

Species distribution of borreliae is highly variable between the continents [3]. Therefore, it is not possible to use one single vaccine worldwide [37]. Vaccines used should contain all infective agents responsible for LB infection in the geographical area. For Europe, these agents are *B. afzelii*, *B. garinii*, and *Bbss* [36]. All vaccines available in Germany are at least bivalent, however, the vaccine used in this study is the only trivalent option containing all three borrelial species. The vaccination, in combination with manual tick removal by the owners and the disciplined use of acaricides and repellents, allows the maximum of protection possible, as removal and repellents alone might not disable all tick attachment. In the authors' opinion, the combination of these options with a vaccine is still the safest method to prevent LB in dogs. However, as ticks not only transmit LB, veterinarians and owners must be aware, that the vaccination is the best protection against LB, tick removal and repellents must still be conducted to protect canines against other TBD.

Retrospective observation originating from LB-vaccinated dogs show, that vaccination against LB is most effective when it is applied on days 0, 30, 180, and 360. When a booster vaccination on day 180 is missed, canines display a gap of immunity in autumn, while ticks still display a high questing activity. For the best protection in dogs, a booster vaccination on day 180 is urgently advised, as has been displayed for equines [39]. Further, the use of a canine LB vaccination in endemic regions, in general, seems highly advisable, especially regarding the One Health concern [65]. An infection with LB probably leads to the unnecessary suffering of many animals, that display clinical signs obvious or hidden to their owners, probably reducing the quality of life in these dogs. Infected dogs displaying clinical signs are treated with antibiotics that could have been renounced. Additionally, canines display a risk to their owners by carrying infected ticks in the urban space or by infecting uninfected ticks in the urban space [65].

5. Conclusions

The results from this retrospective study allow us to recommend a basic vaccination schedule with an additional booster vaccination on day 180 to ensure the best possible protection of dogs against Lyme borreliosis. Concerns regarding side effects seem unreasonable, as most vaccines in humans or dogs can display side effects, as do antibiotics that are necessary after infection. In this study, only 7% of vaccine injections led to side effects such as swelling or sensitivity at the injection site limited to hours or days. These temporally limited side effects cannot be compared to the clinical signs of LB and its' possible chronic course. As such, there is an increasing need for veterinarians to inform dog owners about the importance of LB vaccination. The cost of a vaccination is affordable and side effects are neglectable compared to costs for diagnosis and therapy of LB, especially regarding the dogs' well-being. In the future, it is strongly recommended to repeat this work with a higher number of canines and a longer observation period. The protection capacity of V-basic and V-plus throughout the year and especially the winter months might be an interesting research focus.

Author Contributions: Conceptualization, R.K.S. and C.K.W.; methodology, C.K.W. and S.H.; software, C.K.W. and J.W.; validation, R.K.S. and J.W.; formal analysis, R.K.S., C.K.W. and J.W.; investigation, C.K.W. and S.H.; resources, R.K.S.; data curation, C.K.W.; writing—original draft preparation, C.K.W.; writing—review and editing, R.K.S. and J.W.; visualization, C.K.W. and J.W.; supervision, R.K.S. and J.W.; project administration, R.K.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of LMU Munich (reference number 327-20-09-2022).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Ingo Dübeler for the opportunity to conduct this study in the veterinary practice and for his support. Further, the authors would like to thank the owners of the dogs, that agreed to the use of the residual blood samples to be examined and publicized. We would further like to thank Peter Kraiczky for providing species-specific rOspA antigens specific for *Bbss*, *B. afzelii*, and *B. garinii*.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Gray, J.; Kahl, O.; Zintl, A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick Borne Dis.* **2021**, *12*, 101682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wu, J.; Weening, E.H.; Faske, J.B.; Höök, M.; Skare, J.T. Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires $\beta(1)$ integrins and Src kinase activity. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 1338–1348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Branda, J.A.; Steere, A.C. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2021**, *34*, e00018–e00019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Macleod, J. *Ixodes ricinus* in Relation to its Physical Environment: IV. An Analysis of the Ecological Complexes Controlling Distribution and Activities. *Parasitology* **1936**, *28*, 295–319. [[CrossRef](#)]
- Perret, J.L.; Guigoz, E.; Rais, O.; Gern, L. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* **2000**, *86*, 554–557. [[CrossRef](#)]
- Intergovernmental Panel on Climate Change. *Climate Change 2007—The Physical Science Basis*; Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC): Geneva, Switzerland, 2007.
- Garcia-Vozmediano, A.; Krawczyk, A.L.; Sprong, H.; Rossi, L.; Ramassa, E.; Tomassone, L. Ticks climb the mountains: Ixodid tick infestation and infection by tick-borne pathogens in the Western Alps. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101489. [[CrossRef](#)]
- Martello, E.; Mannelli, A.; Ragagli, C.; Ambrogio, C.; Selmi, M.; Ceballos, L.A.; Tomassone, L. Range expansion of *Ixodes ricinus* to higher altitude, and co-infestation of small rodents with *Dermacentor marginatus* in the Northern Apennines, Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* **2014**, *5*, 970–974. [[CrossRef](#)]
- Hvidsten, D.; Frafjord, K.; Gray, J.S.; Henningsson, A.J.; Jenkins, A.; Kristiansen, B.E.; Lager, M.; Rognerud, B.; Slåtsve, A.M.; Stordal, F.; et al. The distribution limit of the common tick, *Ixodes ricinus*, and some associated pathogens in north-western Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101388. [[CrossRef](#)]
- Lindgren, E.; Gustafson, R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* **2001**, *358*, 16–18. [[CrossRef](#)]
- Dautel, H.; Dippel, C.; Kämmer, D.; Werkhausen, A.; Kahl, O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *Int. J. Med. Microbiol.* **2008**, *298*, 50–54. [[CrossRef](#)]
- Appel, M.J.G.; Allen, S.; Jacobson, R.H.; Lauderdale, T.-L.; Chang, Y.-F.; Shin, S.J.; Thomford, J.W.; Todhunter, R.J.; Summers, B.A. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*, 651–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Straubinger, R.K.; Summers, B.A.; Chang, Y.-F.; Appel, M.J.G. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 111–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Straubinger, R.K.; Straubinger, A.F.; Summers, B.A.; Jacobson, R.H.; Erb, H.N. Clinical manifestation, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1998**, *110*, 874–881. [[PubMed](#)]
- Azuma, Y.; Kawamura, K.; Isogai, H.; Isogai, E. Neurologic abnormalities in two dogs suspected Lyme disease. *Microbiol. Immunol.* **1993**, *37*, 325–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Krupka, I.; Pantchev, N.; Lorentzen, L.; Weise, M.; Straubinger, R.K. Tick-transmitted, bacterial infections in dogs: Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Germany. *Prakt. Tierarzt.* **2007**, *88*, 776.
- Topfer, K.; Straubinger, R.K. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent—A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Prakt. Tierarzt.* **2006**, *87*, 430.
- Krupka, I.; Straubinger, R.K. Lyme Borreliosis in Dogs and Cats: Background, Diagnosis, Treatment and Prevention of Infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2010**, *40*, 1103. [[CrossRef](#)]
- Levy, S.A.; Magnarelli, L.A. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1992**, *200*, 344–347.
- Littman, M.P.; Gerber, B.; Goldstein, R.E.; Labato, M.A.; Lappin, M.R.; Moore, G.E. ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 887–903. [[CrossRef](#)]

21. Aguero-Rosenfeld, M.E.; Wang, G.; Schwartz, I.; Wormser, G.P. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 484–509. [CrossRef]
22. Callister, S.M.; Jobe, D.A.; Schell, R.F.; Lovrich, S.D.; Onheiber, K.L.; Korshus, J.B. Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 3670–3674. [CrossRef] [PubMed]
23. Dennis, D.T. Lyme disease. *Dermatol. Clin.* **1995**, *13*, 537–551. [CrossRef] [PubMed]
24. Kramer, F.; Husken, R.; Krudewagen, E.M.; Deuster, K.; Blagburn, B.; Straubinger, R.K.; Butler, J.; Fingerle, V.; Charles, S.; Settle, T.; et al. Prevention of transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* by *Ixodes* spp. ticks to dogs treated with the Seresto(R) collar (imidacloprid 10% + flumethrin 4.5%). *Parasitol. Res.* **2020**, *119*, 299–315. [CrossRef] [PubMed]
25. Honsberger, N.A.; Six, R.H.; Heinz, T.J.; Weber, A.; Mahabir, S.P.; Berg, T.C. Efficacy of sarolaner in the prevention of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* transmission from infected *Ixodes scapularis* to dogs. *Vet. Parasitol.* **2016**, *222*, 67–72. [CrossRef] [PubMed]
26. Camire, A.C.; Hatke, A.L.; King, V.L.; Millership, J.; Ritter, D.M.; Sobell, N.; Weber, A.; Marconi, R.T. Comparative analysis of antibody responses to outer surface protein (Osp)A and OspC in dogs vaccinated with Lyme disease vaccines. *Vet. J.* **2021**, *273*, 105676. [CrossRef] [PubMed]
27. Rajput, Z.I.; Hu, S.H.; Chen, W.J.; Arijio, A.G.; Xiao, C.W. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **2006**, *7*, 912–921. [CrossRef] [PubMed]
28. Comstedt, P.; Hanner, M.; Schüler, W.; Meinke, A.; Schlegl, R.; Lundberg, U. Characterization and optimization of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis. *Vaccine* **2015**, *33*, 5982–5988. [CrossRef]
29. Straubinger, R.K.; Chang, Y.-F.; Jacobson, R.H.; Appel, M.J.G. Sera from OspA-vaccinated dogs, but not those from tick-infected dogs, inhibit in vitro growth of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 2745–2751. [CrossRef]
30. Yang, X.; Goldberg, M.S.; Popova, T.G.; Schoeler, G.B.; Wikel, S.K.; Hagman, K.E.; Norgard, M.V. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 1470–1479. [CrossRef]
31. Kurokawa, C.; Lynn, G.E.; Pedra, J.H.F.; Pal, U.; Narasimhan, S.; Fikrig, E. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 587–600. [CrossRef]
32. Gipson, C.L.; de Silva, A.M. Interactions of OspA monoclonal antibody C3.78 with *Borrelia burgdorferi* within ticks. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 1644–1647. [CrossRef] [PubMed]
33. Bobe, J.R.; Jutras, B.L.; Horn, E.J.; Embers, M.E.; Bailey, A.; Moritz, R.L.; Zhang, Y.; Soloski, M.J.; Ostfeld, R.S.; Marconi, R.T.; et al. Recent Progress in Lyme Disease and Remaining Challenges. *Front. Med.* **2021**, *8*, 666554. [CrossRef] [PubMed]
34. Hanson, M.S.; Edelman, R. Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease. *Expert Rev. Vaccines* **2003**, *2*, 683–703. [CrossRef] [PubMed]
35. Poland, G.A. Vaccines against Lyme disease: What happened and what lessons can we learn? *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52* (Suppl. 3), s253–s258. [CrossRef] [PubMed]
36. Chomel, B. Lyme disease. *Rev. Sci. Technol.* **2015**, *34*, 569–576. [CrossRef] [PubMed]
37. Gern, L.; Hu, C.M.; 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*, 1551–1557. [CrossRef]
38. Van Hoesche, C.; Lebacqz, E.; Beran, J.; Parenti, D. Alternative vaccination schedules (0, 1, and 6 months versus 0, 1, and 12 months) for a recombinant OspA Lyme disease vaccine. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *28*, 1260–1264. [CrossRef]
39. Knödseder, J.M.; Fell, S.F.; Straubinger, R.K. A study with a commercial vaccine against Lyme borreliosis in horses using two different vaccination schedules: Characterization of the humoral immune response. *Vaccine* **2019**, *37*, 7207–7212. [CrossRef]
40. Sigal, L.H.; Zahradnik, J.M.; Lavin, P.; Patella, S.J.; Bryant, G.; Haselby, R.; Hilton, E.; Kunkel, M.; Adler-Klein, D.; Doherty, T.; et al. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 216–222. [CrossRef]
41. Timcke, M.-L.; Pätzold, A.; Wendler, D.; Flik, I.; Möller, C.; Eckwert, L. ZECKEN-ATLAS 2022. Wo sich Zecken in Deutschland festsaugen. Available online: <https://interaktiv.abendblatt.de/zecken-atlas-deutschland/> (accessed on 24 July 2022).
42. Lindgren, E.; Jaenson, T.; Menne, B.; World Health Organization. *Lyme Borreliosis in Europe: Influences of Climate and Climate Change, Epidemiology, Ecology and Adaptation Measures*; WHO Regional Office for Europe: Copenhagen, Denmark, 2006.
43. Chang, Y.-F.; Appel, M.J.G.; Jacobson, R.H.; Shin, S.J.; Harpending, P.; Straubinger, R.K.; Patrican, L.; Mohammed, H.; Summers, B.A. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 3543–3549. [CrossRef]
44. Hromníková, D.; Furka, D.; Furka, S.; Santana, J.A.D.; Ravingerová, T.; Klöcklerová, V.; Žitňan, D. Prevention of tick-borne diseases: Challenge to recent medicine. *Biologia* **2022**, *77*, 1533–1554. [CrossRef] [PubMed]
45. Friedrich-Löffler-Institut. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. Available online: <https://www.fli.de/de/aktuelles/kurznachrichten/neues-einzelsicht/aktuelle-impfempfehlungen-der-stiko-vet-fuer-kleintiere-und-wiederkaeuer/> (accessed on 16 June 2022).
46. Malter, K.B.; Tugel, M.E.; Gil-Rodriguez, M.; Guardia, G.; Jackson, S.W.; Ryan, W.G.; Moore, G.E. Variability in non-core vaccination rates of dogs and cats in veterinary clinics across the United States. *Vaccine* **2022**, *40*, 1001–1009. [CrossRef] [PubMed]
47. Ford, R.B.; Larson, L.J.; McClure, K.D.; Schultz, R.D.; Welborn, L.V. 2017 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **2017**, *53*, 243–251. [CrossRef]

48. Alekseev, A.N.; Burenkova, L.A.; Vasilieva, I.S.; Dubinina, H.V.; Chunikhin, S.P. Preliminary studies on virus and spirochete accumulation in the cement plug of ixodid ticks. *Exp. Appl. Acarol.* **1996**, *20*, 713–723. [CrossRef]
49. Blasdel, K.R.; Morand, S.; Laurance, S.G.W.; Doggett, S.L.; Hahs, A.; Trinh, K.; Perera, D.; Firth, C. Rats and the city: Implications of urbanization on zoonotic disease risk in Southeast Asia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2022**, *119*, e2112341119. [CrossRef] [PubMed]
50. Vogt, N.A.; Stevens, C.P.G. Why the Rationale for Canine *Borrelia burgdorferi* Vaccination Is Unpersuasive. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 719060. [CrossRef] [PubMed]
51. American Animal Hospital Association. Not Generally Recommended Vaccines for Pet Cats. Available online: <https://www.aaha.org/aaha-guidelines/2020-aahaaafp-feline-vaccination-guidelines/not-recommended-vaccines/> (accessed on 1 August 2022).
52. Straubinger, R.K.; Straubinger, A.F.; Härter, L.; Jacobson, R.H.; Chang, Y.-F.; Summers, B.A.; Erb, H.N.; Appel, M.J.G. *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.* **1997**, *65*, 1273–1285. [CrossRef]
53. Straubinger, R.K. PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 2191–2199. [CrossRef]
54. Adaszek, L.; Gatellet, M.; Mazurek, L.; Dębiak, P.; Skrzypczak, M.; Winiarczyk, S. Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: A case report. *Ann. Parasitol.* **2020**, *66*, 255–257. [CrossRef]
55. Detmer, S.E.; Bouljihad, M.; Hayden, D.W.; Schefers, J.M.; Armien, A.; Wünschmann, A. Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2016**, *28*, 144–149. [CrossRef]
56. Levy, S.A.; Duray, P.H. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. *J. Vet. Intern. Med.* **1988**, *2*, 138–144. [CrossRef] [PubMed]
57. Preyß-Jägeler, C.; Hartmann, K.; Dorsch, R. Role of systemic infections in canine kidney diseases. *Tierarztl. Prax. Ausg. K. Kleintiere Heimtiere* **2022**, *50*, 124–136. [CrossRef] [PubMed]
58. Borys, M.A.; Kass, P.H.; Mohr, F.C.; Sykes, J.E. Differences in clinicopathologic variables between *Borrelia* C6 antigen seroreactive and *Borrelia* C6 seronegative glomerulopathy in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 2096–2104. [CrossRef]
59. Hutton, T.A.; Goldstein, R.E.; Njaa, B.L.; Atwater, D.Z.; Chang, Y.F.; Simpson, K.W. Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected “Lyme nephritis”. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22*, 860–865. [CrossRef]
60. Inokuma, H.; Maetani, S.; Fujitsuka, J.; Takano, A.; Sato, K.; Fukui, T.; Masuzawa, T.; Kawabata, H. Astasia and pyrexia related to *Borrelia garinii* infection in two dogs in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **2013**, *75*, 975–978. [CrossRef]
61. Roush, J.K.; Manley, P.A.; Dueland, R.T. Rheumatoid arthritis subsequent to *Borrelia burgdorferi* infection in two dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1989**, *195*, 951–953. [PubMed]
62. Raya, A.I.; Afonso, J.C.; Perez-Ecija, R.A.; Blanco, B.; Martín-de Las Mulas, J.; Carrasco, L.; Cortade, L.E.; Gomez-Laguna, J. Orbital myositis associated with Lyme disease in a dog. *Vet. Rec.* **2010**, *167*, 663–664. [CrossRef] [PubMed]
63. Kawai, K.; Kawai, A.T.; Wollan, P.; Yawn, B.P. Adverse impacts of chronic pain on health-related quality of life, work productivity, depression and anxiety in a community-based study. *Fam. Pract.* **2017**, *34*, 656–661. [CrossRef]
64. Industrieverband Heimtierbedarf (IHV) e.V. Die Liebe zum Heimtier hält Unvermindert an. Available online: <https://www.ivh-online.de/der-verband/daten-fakten/anzahl-der-heimtiere-in-deutschland.html#:~:text=Die%20Deutschen%20lieben%20das%20Leben,Zierv%C3%B6gel%20in%20Haushalten%20in%20Deutschland.> (accessed on 6 August 2022).
65. Day, M.J. One health: The importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasit. Vectors* **2011**, *4*, 49. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

IV. DISKUSSION

Die unbestreitbaren Auswirkungen des Klimawandels sowie des Temperaturanstiegs weltweit führen zu einer zunehmend ganzjährigen Aktivität der Zecken und vermutlich einem Anstieg ihrer Population (LINDGREN *et al.*, 2006; DAUTEL *et al.*, 2008). Damit erhöht sich auch das Zeckenexpositionsrisiko für Mensch und Tier und das Risiko einer Infektion mit unter anderem *Bb*sl, dem Erreger-Komplex der LB auf das ganze Jahr. Tierbesitzer*innen und Tierärzt*innen sollten sich mit den individuellen Risiken der Hunde (Wohnort, Einsatz des Tieres) und den weiterreichenden Auswirkungen der LB, wie der Einschränkung der Lebensqualität, dem *One-Health*-Gedanken sowie dem Einsatz von Antibiotika und der damit verbundenen Resistenzentwicklung auseinandersetzen, um für jeden Hund den bestmöglichen, zur Verfügung stehenden Schutz zu gewährleisten und adäquat einzusetzen.

Notwendigkeit der Impfung

Als Argument gegen eine Impfung von Hunden wird die Hypothese der LB als „Erkrankung mit geringer klinischer Signifikanz“ aufgeführt (VOGT & STEVENS, 2021). Diese Aussage bezieht sich vor allem auf die seit Jahren zitierte Zahl von nur 5 % klinisch auffälliger Hunde, veröffentlicht von Levy *et al.* im Jahr 1992 (LEVY & MAGNARELLI, 1992). In dieser Studie wurden 234 Hunde auf Antikörper gegen *Bb*sl untersucht und den Ergebnissen entsprechend in eine seronegative ($n = 109$) und eine seropositive Gruppe ($n = 125$) eingeteilt und über einen Zeitraum von 20 Monaten beobachtet. In beiden Gruppen lag die Inzidenz von Gelenkschmerzen, Lethargie, Fieber sowie Inappetenz bei 5 %. Eine Wiederholungsuntersuchung konnte bei 202 Hunden (105 seropositiven und 97 seronegativen) durchgeführt werden. Von den 97 Hunden aus der seronegativen Gruppe sind neun serokonvertiert, allerdings ist unklar, ob und welche klinischen Anzeichen bei diesen Tieren beobachtet wurden. Bei einem Teil der Hunde erfolgte während des Beobachtungszeitraumes eine antibiotische Therapie. Die Diagnose der LB basierte auf klinischen Manifestationen wie Gelenkschmerzen, Fieber, Lethargie und Inap-

petenz sowie dem prompten Ansprechen auf die antibiotische Therapie. Die Ergebnisse dieser Studie sollten aus heutiger Sicht hinterfragt werden, da keine serologischen Ergebnisse oder direkte Nachweise von Borrelien vorlagen und außerdem die Zeitpunkte der tatsächlichen Infektion unbekannt waren. Zudem wurden andere bakterielle Infektionskrankheiten, die ebenfalls auf die eingeleitete antibiotische Therapie hätten ansprechen können, nicht untersucht oder ausgeschlossen. Viele nachfolgende Studien haben außerdem zuverlässige und deutlich abweichende Ergebnisse hervorgebracht. In einem Experiment, durchgeführt von Straubinger *et al.*, konnten bei 75 % der experimentell infizierten Hunde klinische Anzeichen wie Lahmheit beobachtet werden (STRAUBINGER *et al.*, 1997a). In einer weiteren Studie wurden bei 69 % der Hunde klinisch auffällige Arthritiden beobachtet (STRAUBINGER, 2000). Im Zusammenhang mit LB können auch weitere Manifestationen auftreten. Neben den am häufigsten erwähnten klinischen Anzeichen wie Lahmheit, Arthritis, Gelenkschwellung oder Fieber (STRAUBINGER *et al.*, 1997a) sind auch kardiale und neurologische Manifestationen (LEVY & DURAY, 1988; AZUMA *et al.*, 1993; INOKUMA *et al.*, 2013; ADASZEK *et al.*, 2020), Nephritis (HUTTON *et al.*, 2008; BORYS *et al.*, 2019) und Myositis (RAYA *et al.*, 2010) bei Hunden beschrieben. Es stellt sich die Frage, ob Hundebesitzer diese Anzeichen stets in Verbindung mit einem Zeckenstich bringen können, der unter Umständen schon Wochen bis Monate vorher stattgefunden hat. Ebenfalls ist fraglich, ob behandelnde Tierärzte bei solch unspezifischen Anzeichen früh genug LB differentialdiagnostisch in Betracht ziehen und die entsprechende Diagnostik einleiten. Werden nur geringgradig ausgeprägte klinische Anzeichen und zu Beginn der Infektion möglicherweise nur mäßige Schmerzen nicht rechtzeitig erkannt, kann es im weiteren Verlauf der Erkrankung zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität von Hunden kommen. Eine weitere Tatsache, die berücksichtigt werden sollte, ist dass die experimentellen Studien mit *Bbss* durchgeführt wurden. Infektionen mit anderen Genospezies wie *B. garinii* oder *B. afzelii*, welche auf dem europäischen Kontinent ebenfalls vorkommen (STANEK *et al.*, 2011), könnten zu weiteren, noch unerkannten Auswirkungen auf die Gesundheit führen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Impfung, welche als *transmission-blocking vaccination* die Infektion mit den Erregern schon im Vektor verhindert.

Als weiteres Argument gegen die Impfung wird das gute und schnelle Ansprechen

von erkrankten Hunden auf eine antibiotische und analgetische Behandlung aufgeführt (LITTMAN *et al.*, 2018; VOGT & STEVENS, 2021). Der Erfolg der medikamentösen Therapie bei LB ist maßgeblich vom Zeitpunkt des Behandlungsbeginns abhängig sowie einer ausreichend langen Behandlungsdauer (PREAC-MURSIC *et al.*, 1989; ASCH *et al.*, 1994; STRAUBINGER, 2000). Werden aber unter Umständen nur unspezifische klinische Anzeichen nicht mit einem Zeckenstich in Verbindung gebracht, kann bis zur Diagnosestellung eine lange Zeitspanne vergehen. Auch der Nachweis der Infektion ist komplex. Direkte Nachweisverfahren sind zeitaufwendig und fehleranfällig (BARBOUR, 1984; PREAC-MURSIC *et al.*, 1991; STRAUBINGER, 2000; WANG *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2018). Aber auch die indirekten, serologischen Verfahren unterliegen gewissen Limitationen. Die Bildung von spezifischen Antikörpern nach einer Infektion kann bis zu sechs Wochen in Anspruch nehmen (STRAUBINGER *et al.*, 2000). Eine Zeitspanne, welche die Einleitung einer sofortigen und schnellen Therapie nicht ermöglicht. Außerdem können falsch-negative Resultate in diesem zeitlichen Intervall ein falsches Gefühl der Sicherheit vermitteln und fatale Auswirkungen auf die Gesundheit der infizierten Hunde haben. Darüber hinaus kann der Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen zu Nebenwirkungen führen, insbesondere bei Langzeitanwendungen. Antibiotika können das Darmmikrobiom nachhaltig schädigen und Antibiotika-assoziierte gastrointestinale Veränderungen wie Durchfall oder Erbrechen verursachen (WHITTEMORE *et al.*, 2019; VÖRÖS *et al.*, 2022). Bei der Verwendung von Doxycyclin sind außerdem Inappetenz, Gewichtsverlust, Ösophagitis und Erosionen der Ösophagusschleimhaut beschrieben (SCHULZ *et al.*, 2011; SAVADELIS *et al.*, 2018; LE VET BEHEER B.V., 2021). Doch auch bei einer frühzeitig und korrekten antibiotischen Behandlung ist es möglich, dass nicht alle Borrelien im infizierten Wirt eliminiert werden können (STRAUBINGER *et al.*, 1997b). Des Weiteren sind alle Tierärzte im Sinne des *One-Health*-Gedankens angehalten, den Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen weitestgehend zu minimieren (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022). Dies ist dringend erforderlich, um Antibiotikaresistenzen zu vermeiden und so die medikamentöse Versorgung und deren Wirksamkeit bei Menschen sicherzustellen (BASSITTA *et al.*, 2022). Auch in diesem Zusammenhang stellt die Impfung von Hunden gegen die LB eine vielversprechende Option dar, den Einsatz von antibiotischen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin zu reduzieren und somit dem Ansatz der *One-Health*-Strategie zu folgen.

Ein weiterer, zu berücksichtigender Punkt in der Argumentation für eine Impfung von Hunden gegen LB ist ebenfalls im Sinne von *One-Health* das zoonotische Potenzial dieser Erkrankung (DAY, 2011). Zwar findet keine direkte Übertragung von *Bbsl* zwischen Haushunden untereinander oder diesen und Menschen statt (STRAUBINGER *et al.*, 1997a; VOGT & STEVENS, 2021), dennoch können viele Vektor-übertragende Erkrankungen indirekt durch Hunde weiterverbreitet werden. Damit erhöht sich auch für Menschen das Expositionsrisiko mit einem infizierten Vektor. Infizierte oder nicht-infizierte Larven oder Nymphen, welche bei der Blutmahlzeit Borrelien von einem seropositiven Hund aufnehmen, können in unsere Lebensräume (städtische Parks, Gärten) verbracht werden, wo sie vom Hund als Wirt abfallen und die nächste Stufe ihres Lebenszyklus durchlaufen. In diesem Stadium können sie dann potenziell auch Menschen befallen und sie mit Borrelien infizieren (DAY, 2011). Durch die Aufnahme von impfinduzierten Antikörpern von geimpften Hunden würden die Spirochäten schon im Vektor selbst unschädlich gemacht werden (GIPSON & DE SILVA, 2005), was einen indirekten Beitrag der Impfung von Hunden zum Schutz des Menschen bedeutet.

Einstufung als *Non-Core*-Vakzine

Die Argumentation von Vogt *et al.* gegen eine Impfeempfehlung von Hunden gegen LB (VOGT & STEVENS, 2021) stützt sich unter anderem auf die hohe Effektivität und Wirksamkeit von Präventivmaßnahmen wie Repellentien und Ektoparasitika, welche die Blutmahlzeit der Zecke und die Übertragung von Borrelien verhindern sollen (FOURIE *et al.*, 2013b; KONDO *et al.*, 2014; BECSKEI *et al.*, 2020). Werden sie ordnungsgemäß angewandt, stellen sie in den Augen dieser Autoren den Goldstandard in der Infektionsvermeidung dar und machen eine Impfung unnötig (VOGT & STEVENS, 2021). Die Verwendung dieser Schutzmöglichkeiten sollte nicht in Konkurrenz zur Impfung von Hunden stehen. Vielmehr stellt der Gebrauch von Spot-Ons, Sprays, Halsbändern oder Kautabletten eine der drei Säulen im Schutz vor LB dar. Die verschiedenen Optionen sollten für jeden Hund individuell abgewogen und je nach Verträglichkeit eingesetzt werden. Aufgrund der zunehmend ganzjährigen Aktivität von Zecken sollten diese Schutzmaßnahmen nicht nur im Frühjahr und Sommer, sondern das ganze Jahr über angewandt werden. Voraussetzung für die Wirksamkeit ist außerdem die korrekte Anwendung durch die Tierbesitzer. Der Einsatz von Repellentien und Ektoparasitika unterliegt dennoch ebenfalls gewissen Limitationen, da Zecken gegen die Wirkstoffe Resistenzen entwickeln können (RAJPUT *et al.*, 2006). Daher ersetzen diese Schutzmaßnahmen nicht die Impfung der Hunde, sind aber dennoch von entscheidender Bedeutung, da sie nicht nur das Infektionsrisiko mit LB verringern, sondern auch Schutz vor anderen, Vektor-übertragenen Krankheiten wie Babesiose, Ehrlichiose, Anaplasmosen oder Leishmaniose bieten können (FOURIE *et al.*, 2013a; STANNECK & FOURIE, 2013; KRAMER *et al.*, 2020; ALVES *et al.*, 2022).

Zwar spielt die manuelle Entfernung der Zecken in der Prävention eine Rolle (DENNIS, 1995), doch stellt sie nur eine zusätzliche, notwendige und keinesfalls eine alleinige Maßnahme dar, welche eine Impfung unnötig werden ließe. Die Hunde müssen nach jedem Spaziergang oder Aufenthalt im Freien sehr genau abgesucht werden, was nicht nur einen wesentlichen zeitlichen Faktor darstellt, sondern sich aufgrund des Fells der Tiere auch mitunter als schwierig erweisen kann. Jede einzelne Zecke muss gefunden und vollständig entfernt werden. Ist es schon zu einer Ansaugung gekommen, besteht das Risiko, dass bereits Borrelien oder andere pathogene Erreger übertragen wurden.

In Kombination und auch im Hinblick auf die Limitationen der weiteren, erwähnten Präventivmaßnahmen trägt die Impfung maßgeblich zum Schutz der Hunde vor LB bei. Es wird nicht nur ein schwerer Krankheitsverlauf vermieden, sondern schon die Infektion mit den pathogenen Erregern selbst (GIPSON & DE SILVA, 2005). Gemäß der Leitlinie zur Impfung von Kleintieren, evaluiert von der Ständigen Impfkommision Veterinärmedizin, wird die Impfung von Hunden gegen LB als *Non-Core*-Vakzine eingestuft. Dies bedeutet, dass für jeden Hund zur Entscheidungsfindung für oder gegen eine Impfung als Schutzmaßnahme eine individuelle Risikobewertung stattfinden sollte (FRIEDRICH-LÖFFLER-INSTITUT, 2021). Tierbesitzer sowie Tierärzte sollten sich demnach mit den verschiedenen Risikofaktoren, wie der geographischen Lokalisation, möglichen Auslandsaufenthalten oder dem Einsatz der Hunde auseinandersetzen, um eine fundierte Entscheidung für die Gesundheitshaltung der Tiere treffen zu können. Arbeits- und Jagdhunde halten sich häufig in Busch- und Waldgebieten auf und sind somit in hohem Maß dem Risiko von Zeckenbefall und Zeckenstichen ausgesetzt. Ihre Ausbildung ist kosten- und zeitintensiv und eine Infektion mit LB kann diese Hunde ungeeignet für ihre Nutzung als Arbeitshunde machen, da sie aufgrund von Schmerzen, Arthritis, Lahmheiten oder weiteren klinischen Manifestationen nicht mehr die notwendige Leistung erbringen können. Zur Entscheidungsfindung muss auch dringend die Kenntnis über die zunehmend ganzjährige Aktivität von Zecken und deren erweiterte, geographische Verbreitung und Besiedlung neuer Lebensräume einfließen (GRAY *et al.*, 2021). In Deutschland zählen Mecklenburg-Vorpommern, Brandenburg, Berlin, Sachsen-Anhalt, Thüringen, Bayern, Rheinland-Pfalz sowie das Saarland zu den endemischen Risikogebieten (TIMCKE *et al.*, 2022). Für Hunde, die in diesen Bundesländern leben, sollte die Impfung daher besonders in Betracht gezogen werden. Auch etwaige Reisen in diese Gebiete oder sogar ins Ausland sollten in die Entscheidung einfließen, um den bestmöglichen Schutz zu gewährleisten.

Die Entscheidung, Hunde gegen LB zu impfen, sollte also nicht grundsätzlich abgelehnt werden, sondern wie von der Ständigen Impfkommision mit der Einstufung als *Non-Core*-Vakzine angedacht, als Einzelfall mit individueller Risikoabwägung erfolgen.

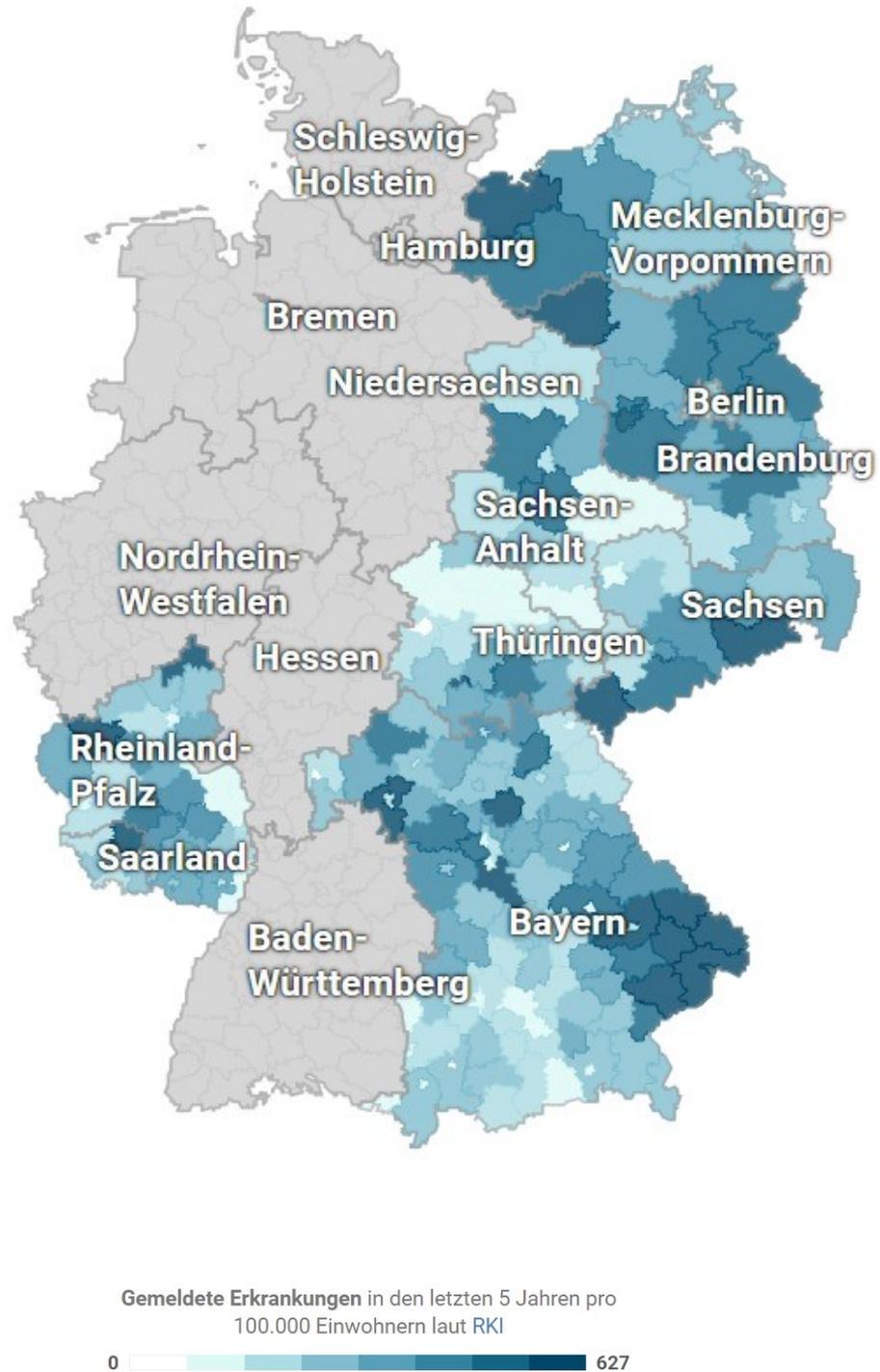


Abbildung 8: Karte der gemeldeten Fälle humaner LB in den Bundesländern mit LB-Meldepflicht in Deutschland der Jahre 2017-2021 (TIMCKE *et al.*, 2022)

Impfstoffe und Impfschemata gegen die Lyme-Borreliose

Für den Erfolg und Nutzen einer jeden Impfung ist die Wahl der Antigene im Impfstoff von entscheidender Bedeutung, so auch im Fall der LB-Impfung der Hunde. Da die Verteilung der Borrelien-Spezies sich zwischen den Kontinenten unterscheidet (BRANDA & STEERE, 2021), ist es nicht möglich weltweit einen gleichen Impfstoff einzusetzen (GERN *et al.*, 1997). Um Hunde bestmöglich vor LB zu schützen, sollten die Impfstoffe Schutz vor denjenigen Spezies bieten, die für die LB-Infektionen in dem jeweiligen geographischen Gebiet verantwortlich sind. In Europa zählen hierzu *B. afzelii*, *B. garinii* sowie *Bbss* (CHOMEL, 2015). Da außerdem nur eine geringe schützende Kreuzreaktivität zwischen den Spezies vorhanden ist, sollten möglichst alle relevanten Borrelien-Spezies im Impfstoff als Antigen enthalten sein (GERN *et al.*, 1997; TOPFER & STRAUBINGER, 2006). Die in Deutschland zugelassenen Impfstoffe sind mindestens bivalent, einzig der dieser Arbeit zu Grunde liegende Impfstoff ist trivalent und bietet so Schutz vor drei Borrelien-Spezies. Die Wahl des Impfstoffes trägt also entscheidend dazu bei, in Kombination mit den weiteren Präventivmaßnahmen den bestmöglichen Schutz vor einer Infektion mit LB zu gewährleisten.

In einer Studie mit Pferden, in welcher die Tiere gegen LB geimpft und zwei Impfschemata miteinander verglichen wurden, konnte bereits gezeigt werden, dass eine zweimalige Immunisierung zwar zu hohen spezifischen Gesamtantikörperspiegeln führte, diese aber bereits nach fünf Monaten einem deutlichen Abfall unterlagen und nur noch in geringer Menge nachzuweisen waren. In der Probandengruppe, in welcher eine zusätzliche Impfung sechs Monate nach der Grundimmunisierung durchgeführt wurde, konnte das spezifische Antikörperniveau signifikant angehoben werden, was auch in den Folgemonaten der Studie beobachtet werden konnte (KNÖDLSEDER *et al.*, 2019). Auch in der Humanmedizin konnte in Studien ein signifikanter Anstieg der protektiven Antikörper gezeigt werden, wenn Menschen nach sechs Monaten eine Booster-Impfung erhalten haben (VAN HOECKE *et al.*, 1999). Die dieser Arbeit zu Grunde liegende, retrospektive Auswertung von Blutproben gegen LB geimpfter Hunde zeigt äquivalente Ergebnisse. Serumproben von Hunden, welche nach den Empfehlungen des Herstellers geimpft wurden (*V-basic*), wurden verglichen mit Hunden, die eine zusätzliche Auffrischungsimpfung sechs Monate nach der Grundimmunisierung erhalten haben (*V-plus*). In beiden Gruppen kam es nach der Grundimmunisierung (zwei Impfungen im Abstand von 21 Tagen)

zu einem erwarteten Anstieg der spezifischen, protektiven Gesamtantikörper. Ab Tag 60 konnte in beiden Gruppen ein steter Abfall der Antikörperkonzentration beobachtet werden. Dieser Abfall konnte in Gruppe *V-basic* bis zur jährlichen Wiederholungsimpfung nach zwölf Monaten weiter beobachtet werden. In den Serumproben der Hunde, die die Auffrischungsimpfung nach sechs Monaten erhalten haben (*V-plus*), konnte nach diesem Booster ein deutlicher Anstieg der spezifischen Antikörper verzeichnet werden und ein langsamerer Abfall dieser im weiteren Beobachtungszeitraum. Während sich die Antikörper der Gruppe *V-basic* nach zwölf Monaten bei durchschnittlich unter 300 KELA-Einheiten befanden, konnten für die Gruppe *V-plus* Durchschnittswerte von über 500 KELA-Einheiten gemessen werden. Die jährliche Wiederholungsimpfung nach zwölf Monaten führte in beiden Gruppen zu Maximalwerten und einem deutlichen Anstieg der spezifischen Antikörperspiegel, welche im Durchschnitt 610 KELA-Einheiten in Gruppe *V-plus* und 588 KELA-Einheiten in Gruppe *V-basic* erreichten. Ausreichend hohe Antikörperspiegel sind unerlässlich für den Infektionsschutz, welcher durch die Impfung erreicht werden soll (GOLDE *et al.*, 1997). Der Vergleich der Antikörperspiegelkinetik zeigt in Gruppe *V-plus* ein deutlich höheres Antikörperviveau, welches über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt und durch die Auffrischungsimpfung sechs Monate nach der Grundimmunisierung erreicht wird. Somit kann die positive Wirkung einer solchen Booster-Impfung auf die protektive Wirkung im ersten Jahr der Grundimmunisierung deutlich abgeleitet werden. Auch die Untersuchung der Serumproben bezüglich der OspA-spezifischen Antikörperfraktionen gegen die einzelnen Genospezies (*Bbss*, *B. afzelii*, *B. garinii*) verdeutlichen den positiven Effekt der zusätzlichen Auffrischung im ersten Jahr. Die Analyse von Serumproben der Hunde, die gemäß den gegenwärtigen Empfehlungen des Herstellers geimpft wurden, zeigt einen deutlichen Peak der spezifischen Antikörper nach der zweimaligen Grundimmunisierung. Im weiteren zeitlichen Verlauf kommt es aber zu einem deutlichen Abfall der Antikörper. Bei der gegen die Genospezies *Bbss* und *B. garinii* untersuchten Antikörperinduktion wurden zum Zeitpunkt der jährlichen Wiederholungsimpfung Durchschnittswerte von 86 KELA-Einheiten gemessen, was unter dem der allgemeinen Lehrmeinung anerkanntem, angenommenen protektiven Minimum von 100 KELA-Einheiten liegt. Auch bei den Untersuchungen der OspA-induzierten Antikörperfraktionen gegen *B. afzelii* wurden nur geringfügig höhere KELA-Einheiten von 115 gemessen. Daraus lässt sich ableiten, dass im Zeitraum

zwischen der Grundimmunisierung und der jährlichen Wiederholungsimpfung womöglich nicht das erforderliche Antikörperlevel erreicht wird, um eine ausreichend protektive Immunantwort zu bilden. Die Serumproben der Hunde, die eine Auffrischungsimpfung nach sechs Monaten im ersten Jahr erhalten haben, zeigen hingegen nach einem zu erwartenden Anstieg der Antikörper nach der Grundimmunisierung und deren Abfall in den folgenden vier Monaten einen erneuten, deutlichen Anstieg der Antikörperspiegel nach dem Booster. Die Antikörper blieben bei allen untersuchten Proben der Gruppe *V-plus* gegen die einzelnen Genospezies deutlich über der Minimalschwelle und erreichten zum Zeitpunkt der jährlichen Auffrischung immer noch über 400 KELA-Einheiten im Durchschnitt, was durch die Impfung nach zwölf Monaten nochmals erhöht wurde. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen deutlich, dass der Impfschutz, welcher durch die gegenwärtige Impfempfehlung aufgebaut werden soll, aus deutlich niedrigeren Antikörperspiegeln und einen schnelleren Abbau dieser im ersten Jahr der Immunisierung besteht als nach einem Impfschema mit einer zusätzlichen Booster-Impfung. Hunde, die nach Herstellerempfehlung geimpft werden, sind womöglich nicht ganzjährig durch die Impfung geschützt, was aufgrund der sich verändernden Klimabedingungen aber eine unerlässliche Forderung an Schutzmaßnahmen gegen eine Infektion mit LB ist. Durch eine zusätzliche Impfung an Tag 120 kann im Angesicht der sich verschärfenden Expositions- und Risikolage, was Zecken und die von ihnen übertragene Infektionskrankheit LB angeht, ein deutlicher Zugewinn an Schutz für Hunde erreicht werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die LB gilt als die häufigste, von Zecken übertragene Krankheit der nördlichen Hemisphäre (WU *et al.*, 2011). Ihre Erreger, Spirochäten aus dem *B.-burgdorferi*-sensu-lato-Komplex, und ihre Vektoren unterliegen einer geographischen Diversität. In Europa zählen *B. garinii*, *B. afzelii* sowie *B. burgdorferi* sensu stricto zu den hauptverantwortlichen Erregern (BRANDA & STEERE, 2021), übertragen zumeist durch den Gemeinen Holzbock (*I. ricinus*) (GRAY *et al.*, 2021). Die unbestreitbaren Auswirkungen des Klimawandels bringen deutliche Veränderungen der Populationsstruktur von Zecken mit sich. Eine zunehmend ganzjährige Aktivität kann beobachtet werden, sowie eine Erweiterung der bisherigen Lebensräume (DAUTEL *et al.*, 2008; GRAY *et al.*, 2009). Dies führt zu einer Erhöhung des Expositionsrisikos für Mensch und Tier und somit auch des Infektionsrisikos mit LB. Im Gegensatz zu Menschen zeigen Hunde nach Infektion und Erkrankung nicht immer eindeutige klinische Anzeichen (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010) und auch die diagnostischen Möglichkeiten unterliegen gewissen Limitationen (STRAUBINGER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2018). Dies führt zu einem zu unentdeckten Krankheitsfällen und zum anderen zu einer langen Zeitspanne vor Beginn der Therapie. Auch wenn diese mit antibiotischen Wirkstoffen bei adäquatem Einsatz die klinischen Anzeichen reduzieren kann (LITTMAN *et al.*, 2018; VOGT & STEVENS, 2021), ist keine vollständige Erregerfreiheit gewährleistet und eine chronische Form der LB möglich (STRAUBINGER *et al.*, 1998). Neben Einschränkungen in der Lebensqualität ist somit auch der wiederholte Einsatz von Medikamenten nötig, um die klinischen Manifestationen zu reduzieren, was potenzielle Nebenwirkungen zur Folge haben kann (SCHULZ *et al.*, 2011; WHITTEMORE *et al.*, 2019). Aber auch im Sinne des *One-Health*-Gedankens, der eine Reduktion des Antibiotikaeinsatzes in der Veterinärmedizin fordert (BASSITTA *et al.*, 2022; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022), sollte über die zur Verfügung stehenden Schutzmaßnahmen Kenntnis herrschen. Die manuelle Zeckensuche sowie die Anwendung von Ektoparasitika sind wertvolle Maßnahmen, um Hunde vor LB sowie anderen, von Zecken übertragenen Krankheiten zu schützen (DENNIS, 1995; HONSBERGER *et al.*, 2016; KRAMER *et al.*, 2020), doch auch sie unterliegen Limitationen (RAJPUT *et al.*, 2006). Daher stellt die Imp-

fung gegen LB eine unerlässliche, prophylaktische Maßnahme dar, um den bestmöglichen Schutz von Hunden zu gewährleisten, da nicht nur ein schwerer Krankheitsverlauf, sondern schon die Infektion selbst verhindert wird. Um diese protektive Wirkung bestmöglich zu nutzen, sollten nicht nur diejenigen Antigene im Impfstoff enthalten sein, die für das Infektionsgeschehen verantwortlich sind, sondern auch ein Impfschema angewandt werden, mit welchem zuverlässig ausreichend hohe Antikörper erreicht werden können.

Die Ergebnisse der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Studie zeigen deutliche Unterschiede in der Antikörperspiegelkinetik abhängig vom angewandten Impfschema auf. Hunde, die eine zusätzliche Booster-Impfung im ersten Jahr der Grundimmunisierung erhalten haben, konnten deutlich länger deutlich höhere Antikörper ausbilden als solche, die nach den gegenwärtigen Empfehlungen des Herstellers geimpft wurden. Gleiches zeigen auch die Ergebnisse der Analysen der OspA-spezifischen Antikörper gegen die einzelnen Genospezies. Da der Schutz der Impfung in direktem Zusammenhang mit dem Erhalt und der Höhe der gebildeten Antikörper steht, hat die Booster-Impfung einen positiven Einfluss auf die protektive Wirkung. Es liegt also nahe, das derzeitig empfohlene Impfschema durch eine zusätzliche Antigenverabreichung nach sechs Monaten zu ergänzen, um den bestmöglichen Schutz in Anbetracht des steigenden Infektionsrisikos zu gewährleisten.

VI. SUMMARY

LB is considered the most common tick-borne disease in the northern hemisphere (WU *et al.*, 2011). Its causative agents, spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato-complex, and their vectors are displaying geographical diversity. In Europe, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto are among the main responsible pathogens (BRANDA & STEERE, 2021), transmitted mostly by the sheep tick (*I. ricinus*) (GRAY *et al.*, 2021). The undeniable effects of climate change cause significant changes in the population structure of ticks. Increasing year-round activity can be observed, as well as an expansion of previous habitats (DAUTEL *et al.*, 2008; GRAY *et al.*, 2009). This leads to an increase in the risk of exposure for humans and animals and thus also in the risk of infection with LB. In contrast to humans, dogs do not always show clear clinical signs after infection (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010) and diagnostic possibilities are also subject to certain limitations (STRAUBINGER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001; NUNES *et al.*, 2018). This leads on the one hand to undetected cases of disease and on the other hand to a long period of time before the start of therapy. Although therapy can reduce the clinical signs when antibiotic agents are used adequately (LITTMAN *et al.*, 2018; VOGT & STEVENS, 2021), complete clearance of the pathogen is not guaranteed and a chronic form of LB is possible (STRAUBINGER *et al.*, 1998). Thus, in addition to limitations in quality of life, repeated use of medication is necessary to reduce clinical manifestations, which may result in potential side effects (SCHULZ *et al.*, 2011; WHITTEMORE *et al.*, 2019). In addition, the One Health concern demands the reduction of antibiotic use in veterinary medicine (BASSITTA *et al.*, 2022; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022), a consequently awareness about further available protective measures is essential. Manual tick screening and the use of ectoparasitics are valuable measures to protect dogs from LB and other tick-borne diseases (DENNIS, 1995; HONSBERGER *et al.*, 2016; KRAMER *et al.*, 2020), but they are also subject to limitations (RAJPUT *et al.*, 2006). Therefore, vaccination against LB represents an essential prophylactic measure to ensure the best possible protection of dogs, since not only a severe course of the disease but already the infection itself is prevented. In order to make the best possible use of this protective effect, the vaccine should not only contain those antigens that are responsible for the infection, but further, a vaccination

scheme should be used, that reliably induces sufficiently high protective antibodies levels.

The results of the study on which this work is based show clear differences in antibody kinetics depending on the vaccination scheme applied. Dogs that received an additional booster vaccination in the first year of basic immunization were able to form significantly higher specific antibody levels for significantly longer than those vaccinated according to the current manufacturer's recommendations. The same results were observed when analyzing the OspA-specific antibodies against the single genospecies. Since the protection of the vaccination is directly related to the maintenance and level of antibodies formed, booster vaccination has a positive impact on the protective effect. Therefore, it seems necessary to add an additional antigen administration after six months to the currently recommended vaccination regime to ensure the best possible protection regarding the increasing risk of infection.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann R, Horstrup P, Schmidt R. Tick-borne meningopolyneuritis (Garin-Bujadoux, Bannwarth). *Yale Journal of Biology and Medicine* 1984; 57: 485-90.

Adaszek Ł, Gatellet M, Mazurek Ł, Dębiak P, Skrzypczak M, Winiarczyk S. Myocarditis secondary to *Borrelia* infection in a dog: a case report. *Ann Parasitol* 2020; 66: 255-7.

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

Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC. The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlated with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 with mild and brief arthritis. *Infect.Immun.* 1999; 67: 173-81.

Alcon-Chino MET, De-Simone SG. Recent Advances in the Immunologic Method Applied to Tick-Borne Diseases in Brazil. *Pathogens* 2022; 11

Alfredsson M, Olafsson E, Eydal M, Unnsteinsdottir ER, Hansford K, Wint W, Alexander N, Medlock JM. Surveillance of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in Iceland. *Parasit Vectors* 2017; 10: 466.

Alves GB, de Oliveira TCB, Rodas LC, Rozza DB, Nakamura AA, Ferrari ED, da Silva DRR, Santos GMD, Calemes EB, Requena K, Nagata WB, Santos-Doni TR, Bresciani KDS. Efficacy of imidacloprid/flumethrin collar in preventing canine leishmaniosis in Brazil. *Transbound Emerg Dis* 2022; 69: e2302-e11.

Anderson JF. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand J Infect Dis Suppl* 1991; 77: 23-34.

Appel MJG. Lyme disease in dogs and cats. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1990; 12: 617-26.

Appel MJG, Allen S, Jacobson RH, Lauderdale T-L, Chang Y-F, Shin SJ, Thomford JW, Todhunter RJ, Summers BA. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 167: 651-64.

Arvikar SL, Steere AC. Diagnosis and treatment of Lyme arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 269-80.

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

Aydintug MK, Gu Y, Philipp MT. *Borrelia burgdorferi* antigens that are targeted by antibody-dependent, complement-mediated killing in the rhesus monkey. *Infection and Immunity* 1994; 62: 4929-37.

Azuma Y, Kawamura K, Isogai H, Isogai E. Neurologic abnormalities in two dogs suspected Lyme disease. *Microbiol.Immunol.* 1993; 37: 325-9.

Azuma Y, Isogai E, Isogai H, Kawamura K. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *Vet.Rec.* 1994; 134: 369-72.

Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schriefer ME, Gilmore RD, Jr., Philipp MT, Steere AC, Wormser GP, Marques AR, Johnson BJ. Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J.Infect.Dis.* 2003; 187: 1187-99.

Baldwin XL, Spanheimer PM, Downs-Canner S. A Review of Immune Checkpoint Blockade for the General Surgeon. *J Surg Res* 2023; 281: 289-98.

Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale Journal of Biology and Medicine* 1984; 57: 521-5.

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

Barthold SW, deSouza M, Feng S. Serum-mediated resolution of Lyme arthritis in mice. *Lab Invest* 1996; 74: 57-67.

Bassitta R, Nottensteiner A, Bauer J, Straubinger RK, Hölzel CS. Spread of antimicrobial resistance genes via pig manure from organic and conventional farms in the presence or absence of antibiotic use. *J Appl Microbiol* 2022;

Becskei C, Geurden T, Erasmus H, Cuppens O, Mahabir SP, Six RH. Comparative speed of kill after treatment with Simparica™ (sarolaner) and Advantix®(imidacloprid + permethrin) against induced infestations of *Dermacentor reticulatus* on dogs. *Parasit Vectors* 2016a; 9: 104.

Becskei C, De Bock F, Illambas J, Cherni JA, Fourie JJ, Lane M, Mahabir SP, Six RH. Efficacy and safety of a novel oral isoxazoline, sarolaner (Simparica™), for the treatment of sarcoptic mange in dogs. *Vet Parasitol* 2016b; 222: 56-61.

Becskei C, Liebenberg J, Thys M, Mahabir SP. Efficacy of a novel chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against four common tick species infesting dogs in Europe. *Parasit Vectors* 2020; 13: 100.

Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from *erythema migrans* lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 359-61.

Berglund J, Eitrem R, Ornstein K, Lindberg A, Ringér 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: 1319-27.

Beugnet F, Halos L, Larsen D, Labuschagné M, Erasmus H, Fourie J. The ability of an oral formulation of afoxolaner to block the transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs. *Parasit Vectors* 2014; 7: 283.

Bloomquist JR. Ion channels as targets for insecticides. *Annu Rev Entomol* 1996; 41: 163-90.

Boland LA, Angles JM. Feline permethrin toxicity: retrospective study of 42 cases. *J Feline Med Surg* 2010; 12: 61-71.

Booth CE, Jr., Powell-Pierce AD, Skare JT, Garcia BL. *Borrelia miyamotoi* FbpA and FbpB Are Immunomodulatory Outer Surface Lipoproteins With Distinct Structures and Functions. *Front Immunol* 2022; 13: 886733.

Borys MA, Kass PH, Mohr FC, Sykes JE. Differences in clinicopathologic variables between *Borrelia* C6 antigen seroreactive and *Borrelia* C6 seronegative glomerulopathy in dogs. J Vet Intern Med 2019; 33: 2096-104.

Bouattour A, Ghorbel A, Chabchoub A, Postic D. Lyme borreliosis situation in North Africa. Archives de l'Institut Pasteur de Tunis 2004; 81: 13-20.

Boulanger N (2018) Skin and arthropod vectors. Academic Press

Branda JA, Steere AC. Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clin Microbiol Rev 2021; 34

Bundestierärztekammer. Anmerkungen zur neuen TÄHAV. 2018: file:///C:/Users/claud/Downloads/DTBI_09_2018_TAeHAV-Anmerkungen.pdf.pdf. 2023/1/25.

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

Callister SM, Jobe DA, Schell RF, Lovrich SD, Onheiber KL, Korshus JB. Detection of borreliacidal antibodies in dogs after challenge with *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes scapularis* ticks. J.Clin.Microbiol. 2000; 38: 3670-4.

Camire AC, Hatke AL, King VL, Millership J, Ritter DM, Sobell N, Weber A, Marconi RT. Comparative analysis of antibody responses to outer surface protein (Osp)A and OspC in dogs vaccinated with Lyme disease vaccines. Vet J 2021; 273: 105676.

Carroll JA, Garon CF, Schwan TG. Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. Infect.Immun. 1999; 67: 3181-7.

Chang Y-F, Appel MJG, Jacobson RH, Shin SJ, Harpending P, Straubinger RK, Patrican L, Mohammed H, Summers BA. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 1995; 63: 3543-9.

Chmelař J, Kotál J, Kovařiková A, Kotsyfakis M. The Use of Tick Salivary Proteins as Novel Therapeutics. *Front Physiol* 2019; 10: 812.

Chomel B. Lyme disease. *Rev Sci Tech* 2015; 34: 569-76.

Chowdhury DR, Angov E, Kariuki T, Kumar N. A Potent Malaria Transmission Blocking Vaccine Based on Codon Harmonized Full Length Pfs48/45 Expressed in *Escherichia coli*. *PLoS One* 2009; 4: e6352.

Clark DD. Lower temperature limits for activity of several *Ixodid* ticks (Acari: Ixodidae): effects of body size and rate of temperature change. *J Med Entomol* 1995; 32: 449-52.

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

Combs M, Marcinkiewicz AL, Dupuis AP, 2nd, Davis AD, Lederman P, Nowak TA, Stout JL, Strle K, Fingerle V, Margos G, Ciota AT, Diuk-Wasser MA, Kolokotronis SO, Lin YP. Phylogenomic Diversity Elucidates Mechanistic Insights into Lyme *Borreliae*-Host Association. *mSystems* 2022; 7: e0048822.

Comstedt P, Hanner M, Schüler W, Meinke A, Schlegl R, Lundberg U. Characterization and optimization of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis. *Vaccine* 2015; 33: 5982-8.

Conlon JA, Mather TN, Tanner P, Gallo G, Jacobson RH. Efficacy of a nonadjuvanted, outer surface protein A, recombinant vaccine in dogs after challenge by ticks naturally infected with *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* 2000; 1: 96-107.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis* 1984; 149: 789-95.

Cunze S, Glock G, Kochmann J, Klimpel S. Ticks on the move-climate change-induced range shifts of three tick species in Europe: current and future habitat suitability for *Ixodes ricinus* in comparison with *Dermacentor reticulatus* and *Dermacentor marginatus*. *Parasitol Res* 2022; 121: 2241-52.

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). *Veterinary Pathology* 1997; 34: 85-96.

Dantas-Torres F, Capelli G, Giannelli A, Ramos RA, Lia RP, Cantacessi C, de Caprariis D, De Tommasi AS, Latrofa MS, Lacasella V, Tarallo VD, Di Paola G, Quorollo B, Breitschwerdt E, Stanneck D, Otranto D. Efficacy of an imidacloprid/flumethrin collar against fleas, ticks and tick-borne pathogens in dogs. *Parasit Vectors* 2013; 6: 245.

Dautel H, Dippel C, Kämmer D, Werkhausen A, Kahl O. Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest. *International Journal of Medical Microbiology* 2008; 298: 50-4.

Day MJ. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasit Vectors* 2011; 4: 49.

de Silva AM, Telford SR, 3rd, Brunet LR, Barthold SW, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J Exp Med* 1996; 183: 271-5.

de Silva AM, Zeidner NS, Zhang Y, Dolan MC, Piesman J, Fikrig E. Influence of outer surface protein A antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infect.Immun.* 1999; 67: 30-5.

de Weille JR, Leinders T. The action of pyrethroids on sodium channels in myelinated nerve fibres and spinal ganglion cells of the frog. *Brain Res* 1989; 482: 324-32.

Dennis DT. Lyme disease. *Dermatology and Clinics* 1995; 13: 537-51.

Dennis DT, Nekomoto TS, Victor JC, Paul WS, Piesman J. Reported distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *J Med Entomol* 1998; 35: 629-38.

Detmer SE, Bouljihad M, Hayden DW, Schefers JM, Armien A, Wünschmann A. Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. *J Vet Diagn Invest* 2016; 28: 144-9.

Doff SC, Wenderlein J, Wiesinger A, Hiereth S, Ulrich S, Straubinger RK. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Specific Antibodies in Sera of Canine and Equine Origin-A Comparative Study with Two Line Immunoassays. *Vet Sci* 2022; 9

Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 167: 392-400.

Duscher GG, Peschke R, Tichy A. Mechanical tools for the removal of *Ixodes ricinus* female ticks--differences of instruments and pulling or twisting? *Parasitol Res* 2012; 111: 1505-11.

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. Pathogen transmission in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9: 535-42.

Endris RG, Everett R, Cunningham J, Katz TL, Thompson K. Efficacy of two 65 % permethrin spot-on formulations against canine infestations of *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Ther* 2002; 3: 326-33.

European medicines agency. Antimicrobial resistance in veterinary medicine. 2022: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance-veterinary-medicine>. 2022/08/20.

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.* 1992; 89: 5418-21.

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.

Fish AE, Pride YB, Pinto DS. Lyme carditis. Infect Dis Clin North Am 2008; 22: 275-88, vi.

Fourie JJ, Stanneck D, Jongejan F. Prevention of transmission of *Babesia canis* by *Dermacentor reticulatus* ticks to dogs treated with an imidacloprid/flumethrin collar. Vet Parasitol 2013a; 192: 273-8.

Fourie JJ, Luus HG, Stanneck D, Jongejan F. The efficacy of Advantix® to prevent transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Parasite 2013b; 20: 36.

Fourie JJ, Liebenberg JE, Horak IG, Taenzler J, Heckerroth AR, Frénais R. Efficacy of orally administered fluralaner (Bravecto™) or topically applied imidacloprid/moxidectin (Advocate®) against generalized demodicosis in dogs. Parasit Vectors 2015; 8: 187.

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 : IJMM 2008; 298

Friedrich-Löffler-Institut. Leitlinie zur Impfung von Kleintieren. 2021: <https://www.fli.de/de/aktuelles/kurznachrichten/neues-einzelansicht/aktuelle-impfempfehlungen-der-stiko-vet-fuer-kleintiere-und-wiederkaeuer/>. 2022/06/16.

Gade A, Matin T, Rubenstein R, Robinson CA. *Acrodermatitis Chronica Atrophicans*. In: StatPearlsTreasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC. 2022:

Gammons M, Salam G. Tick removal. Am Fam Physician 2002; 66: 643-5.

Gassel M, Wolf C, Noack S, Williams H, Ilg T. The novel isoxazoline ectoparasiticide fluralaner: selective inhibition of arthropod γ -aminobutyric acid- and L-glutamate-gated chloride channels and insecticidal/acaricidal activity. Insect Biochem Mol Biol 2014; 45: 111-24.

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.

Gern L, Estrada-Pena A, Frandsen F, Gray JS, Jaenson TG, Jongejan F, Kahl O, Korenberg E, Mehl R, Nuttall PA. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zbl.Bakt.* 1998; 287: 196-204.

Gipson CL, de Silva AM. Interactions of OspA monoclonal antibody C3.78 with *Borrelia burgdorferi* within ticks. *Infect.Immun.* 2005; 73: 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, Piesman J, Dolan MC, Kramer MD, 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; 65: 882-9.

Gray J. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Review of Medical and Veterinary Entomology* 1991; 79: 323-33.

Gray J, Dautel H, Estrada-Peña A, Kahl O, Lindgren E. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases* 2009; 2009

Gray J, Kahl O, Zintl A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12: 101682.

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

Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G (2002) Lyme borreliosis; biology, epidemiology and control. CABI Publishing, Oxon

Gray JS, Kahl O, Lane RS, Levin ML, Tsao JI. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7: 992-1003.

Grimm D, Tilly K, Byram R, Stewart PE, Krum JG, Bueschel DM, Schwan TG, Policastro PF, Elias AF, Rosa PA. Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 3142-7.

Haddad V, Jr., Haddad MR, Santos M, Cardoso JLC. Skin manifestations of tick bites in humans. *An Bras Dermatol* 2018; 93: 251-5.

Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 12764-7.

Halperin JJ. Neurologic Manifestations of Lyme Disease. *Current Infectious Disease Reports* 2011; 13: 360-6.

Hanincová K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 2003; 126: 11-20.

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

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

Hevers W, Lüddens H. The diversity of GABAA receptors. *Molecular neurobiology* 1998; 18: 35-86.

Honsberger NA, Six RH, Heinz TJ, Weber A, Mahabir SP, Berg TC. Efficacy of sarolaner in the prevention of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* transmission from infected *Ixodes scapularis* to dogs. *Vet Parasitol* 2016; 222: 67-72.

Huggins LG, Stevenson M, Baydoun Z, Mab R, Khouri Y, Schunack B, Traub RJ. Field trial investigating the efficacy of a long-acting imidacloprid 10%/flumethrin 4.5% polymer matrix collar (Seresto®, Elanco) compared to monthly topical fipronil for the chemoprevention of canine tick-borne pathogens in Cambodia. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis* 2022; 2: 100095.

Hulínská D. [Diagnosis of Lyme borreliosis with western blotting]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1997; 46: 3-8.

Hutton TA, Goldstein RE, Njaa BL, Atwater DZ, Chang YF, Simpson KW. Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected "Lyme nephritis". *J Vet Intern Med* 2008; 22: 860-5.

Hyde JA, Trzeciakowski JP, Skare JT. *Borrelia burgdorferi* alters its gene expression and antigenic profile in response to CO₂ levels. *J Bacteriol* 2007; 189: 437-45.

Inokuma H, Maetani S, Fujitsuka J, Takano A, Sato K, Fukui T, Masuzawa T, Kawabata H. Astasia and pyrexia related to *Borrelia garinii* infection in two dogs in Hokkaido, Japan. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 975-8.

Isaacs R. *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *Journal of Clinical Investigation* 1994; 93: 809-19.

Jacobson RH, Chang Y-F, Shin SJ. Lyme disease: Laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)* 1996; 11: 172-82.

Jaenson TG, Jaenson DG, Eisen L, Petersson E, Lindgren E. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. *Parasit Vectors* 2012; 5: 8.

Johnson BJ, Robbins KE, Bailey RE, Cao BL, Sviat SL, Craven RB, Mayer LW, Dennis DT. Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J Infect Dis* 1996; 174: 346-53.

Jongejan F, Crafford D, Erasmus H, Fourie JJ, Schunack B. Comparative efficacy of oral administrated afoxolaner (NexGard™) and fluralaner (Bravecto™) with topically applied permethrin/imidacloprid (Advantix®) against transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasit Vectors* 2016; 9: 348.

Kahl O, Knülle W. Water vapour uptake from subsaturated atmospheres by engorged immature ixodid ticks. *Exp Appl Acarol* 1988; 4: 73-83.

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. Zentralbl Bakteriol 1998; 287: 41-52.

Kahl O, Gray JS. The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. Ticks and Tick-Borne Diseases 2023; 14: 102114.

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.

Karvonen K, Nykky J, Marjomäki V, Gilbert L. Distinctive Evasion Mechanisms to Allow Persistence of *Borrelia burgdorferi* in Different Human Cell Lines. Front Microbiol 2021; 12: 711291.

Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. FEMS Immunol Med Microbiol 2012; 66: 1-19.

Kilp S, Ramirez D, Allan MJ, Roepke RK, Nuernberger MC. Pharmacokinetics of fluralaner in dogs following a single oral or intravenous administration. Parasit Vectors 2014; 7: 85.

Klaus C, Hoffmann B, Hering U, Mielke B, Sachse K, Beer M, Süss J. Tick-borne encephalitis (TBE) virus prevalence and virus genome characterization in field-collected ticks (*Ixodes ricinus*) from risk, non-risk and former risk areas of TBE, and in ticks removed from humans in Germany. Clin Microbiol Infect 2010; 16: 238-44.

Knödseder JM, Fell SF, Straubinger RK. A study with a commercial vaccine against Lyme borreliosis in horses using two different vaccination schedules: Characterization of the humoral immune response. Vaccine 2019; 37: 7207-12.

Kogan K, Haapasalo K, Kotila T, Moore R, Lappalainen P, Goldman A, Meri T. Mechanism of *Borrelia* immune evasion by FhbA-related proteins. PLoS Pathog 2022; 18: e1010338.

Kondo Y, Kinoshita G, Drag M, Chester TS, Larsen D. Evaluation of the efficacy of afoxolaner against *Haemaphysalis longicornis* on dogs. *Vet Parasitol* 2014; 201: 229-31.

Kraiczy 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. *Eur.J.Immunol.* 2001; 31: 1674-84.

Kramer F, Husken R, Krudewagen EM, Deuster K, Blagburn B, Straubinger RK, Butler J, Fingerle V, Charles S, Settje T, Schunack B, Stanneck D. Prevention of transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* by *Ixodes* spp. ticks to dogs treated with the Seresto(R) collar (imidacloprid 10% + flumethrin 4.5%). *Parasitol Res* 2020; 119: 299-315.

Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Vet.Clin.North Am.Small Anim Pract.* 2010; 40: 1103-19.

Kuhr RJ, Motoyama N (1998) Pesticides and the future: minimizing chronic exposure of humans and the environment. IOS Press

Kurokawa C, Lynn GE, Pedra JHF, Pal U, Narasimhan S, Fikrig E. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nat Rev Microbiol* 2020; 18: 587-600.

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

Laaksonen M, Sajanti E, Sormunen JJ, Penttinen R, Hänninen J, Ruohomäki K, Sääksjärvi I, Vesterinen EJ, Vuorinen I, Hytönen J, Klemola T. Crowdsourcing-based nationwide tick collection reveals the distribution of *Ixodes ricinus* and *I. persulcatus* and associated pathogens in Finland. *Emerg Microbes Infect* 2017; 6: e31.

LaFleur RL, Callister SM, Dant JC, Jobe DA, Lovrich SD, Warner TF, Wasmoen TL, Schell RF. One-year duration of immunity induced by vaccination with a canine Lyme disease bacterin. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 870-4.

Le Vet Beheer B.V. GEBRAUCHSINFORMATION

Doxybactin 400 mg Tabletten für Hunde. 2021:
<https://cms.medikamio.com/downloads/de-at/drugs/doxybactin-400-mg-tabletten-fur-hunde.pdf>. 2022/08/20.

Leong JM, Morrissey PE, Ortega-Barria E, Pereira MEA, Coburn J. Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1995; 63: 874-83.

Leschnik MW, Kirtz G, Khanakah G, Duscher G, Leidinger E, Thalhammer JG, Joachim A, Stanek G. Humoral immune response in dogs naturally infected with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and in dogs after immunization with a *Borrelia* vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 828-35.

Levy S, O'Connor TP, Hanscom JL, Shields P. Utility of an in-office C6 ELISA test kit for determination of infection status of dogs naturally exposed to *Borrelia burgdorferi*. *Vet Ther* 2002; 3: 308-15.

Levy SA, Duray PH. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1988; 2: 138-44.

Levy SA, Magnarelli LA. Relationship between development of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in dogs and the subsequent development of limb/joint borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 200: 344-7.

Levy SA, Barthold SW, Daubach DM, Wasmoen TL. Canine Lyme borreliosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1993; 15: 833-48.

Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJB, Miller JN, Philipp MT. Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *JCM* 1999; 37: 3990-6.

Liang FT, Jacobson RH, Straubinger RK, Grooters A, Philipp MT. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Clin.Microbiol.* 2000; 38: 4160-6.

Lin YP, Tan X, Caine JA, Castellanos M, Chaconas G, Coburn J, Leong JM. Strain-specific joint invasion and colonization by Lyme disease spirochetes is promoted by outer surface protein C. *PLoS Pathog* 2020; 16: e1008516.

Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 119-23.

Lindgren E, Jaenson T, Menne B, Organization WH (2006) Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe

Littman MP, Gerber B, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 887-903.

Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N Engl J Med* 1990; 323: 1438-44.

Long KC, Cohn KA. Lyme Arthritis: An Update for Clinical Practice. *Pediatr Emerg Care* 2018; 34: 588-91.

Lummis SC. GABA receptors in insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 1990; 95: 1-8.

Macdonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annual review of neuroscience* 1994; 17: 569-602.

Macleod J. *Ixodes ricinus* in Relation to its Physical Environment: IV. An Analysis of the Ecological Complexes Controlling Distribution and Activities. *Parasitology* 1936; 28: 295-319.

- Magnarelli LA, Anderson JF. Early detection and persistence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in persons with Lyme disease. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A 1987; 263: 392-9.
- Magnarelli LA, Anderson JF, Fish D. Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). J.Infect.Dis. 1987; 156: 234-6.
- Maitre A, Wu-Chuang A, Aželytė J, Palinauskas V, Mateos-Hernández L, Obregon D, Hodžić A, Valiente Moro C, Estrada-Peña A, Paoli JC, Falchi A, Cabezas-Cruz A. Vector microbiota manipulation by host antibodies: the forgotten strategy to develop transmission-blocking vaccines. Parasit Vectors 2022; 15: 4.
- Maraspin V, Strle F. Borreliell lymphocytoma. Wien Klin Wochenschr 2022;
- 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.
- Marques AR. Lyme disease: a review. Curr Allergy Asthma Rep 2010; 10: 13-20.
- Martin A, Campbell A. Permethrin toxicity in cats. Vet Rec 2000; 147: 639.
- Martin Y, Zimmerli S. [Lyme Disease - Epidemiology and Pathophysiology]. Ther Umsch 2022; 79: 441-7.
- McAlister HF, Klementowicz PT, Andrews C, Fisher JD, Feld M, Furman S. Lyme carditis: an important cause of reversible heart block. Ann Intern Med 1989; 110: 339-45.
- McCall JW, Varloud M, Hodgkins E, Mansour A, DiCosty U, McCall S, Carmichael J, Carson B, Carter J. Shifting the paradigm in *Dirofilaria immitis* prevention: blocking transmission from mosquitoes to dogs using repellents/insecticides and macrocyclic lactone prevention as part of a multimodal approach. Parasit Vectors 2017; 10: 525.
- McDowell JV, Sung SY, Hu LT, Marconi RT. Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with Lyme disease spirochetes. Infect Immun 2002; 70: 4196-203.

Mead PS. Epidemiology of Lyme disease. *Infect Dis Clin North Am* 2015; 29: 187-210.

Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors* 2013; 6: 1.

Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 2015; 6: 262.

Moniuszko-Malinowska A, Czupryna P, Dunaj J, Pancewicz S, Garkowski A, Kondrusik M, Grygorczuk S, Zajkowska J. *Acrodermatitis chronica atrophicans*: various faces of the late form of Lyme borreliosis. *Postepy Dermatol Alergol* 2018; 35: 490-4.

Muehlenbachs A, Bollweg BC, Schulz TJ, Forrester JD, DeLeon Carnes M, Molins C, Ray GS, Cummings PM, Ritter JM, Blau DM, Andrew TA, Prial M, Ng DL, Prahlow JA, Sanders JH, Shieh WJ, Paddock CD, Schriefer ME, Mead P, Zaki SR. Cardiac Tropism of *Borrelia burgdorferi*: An Autopsy Study of Sudden Cardiac Death Associated with Lyme Carditis. *Am J Pathol* 2016; 186: 1195-205.

Murfin KE, Kleinbard R, Aydin M, Salazar SA, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* chemotaxis toward tick protein Salp12 contributes to acquisition. *Ticks Tick Borne Dis* 2019; 10: 1124-34.

Mygland Å, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology* 2010; 17: 8-e4.

Narahashi T. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79: 1-14.

Needham GR. Evaluation of five popular methods for tick removal. *Pediatrics* 1985; 75: 997-1002.

Needham GR, Teel PD. Off-host physiological ecology of *Ixodid* ticks. *Annu Rev Entomol* 1991; 36: 659-81.

Nolzen H, Brugger K, Reichold A, Brock J, Lange M, Thulke HH. Model-based extrapolation of ecological systems under future climate scenarios: The example of *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One* 2022; 17: e0267196.

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.

Nunes M, Parreira R, Carreira T, Inácio J, Vieira ML. Development and evaluation of a two-step multiplex TaqMan real-time PCR assay for detection/quantification of different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Ticks Tick Borne Dis* 2018; 9: 176-82.

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.

Oliveira CJ, Sá-Nunes A, Francischetti IM, Carregaro V, Anatriello E, Silva JS, Santos IK, Ribeiro JM, Ferreira BR. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J Biol Chem* 2011; 286: 10960-9.

Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, Schäfer C, Wellensiek HJ, Pflughaupt KW. Stages and syndromes of neuroborreliosis. *J Neurol* 1998; 245: 262-72.

Otranto D. Arthropod-borne pathogens of dogs and cats: From pathways and times of transmission to disease control. *Vet Parasitol* 2018; 251: 68-77.

Ozoe Y, Asahi M, Ozoe F, Nakahira K, Mita T. The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391: 744-9.

Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, Lobet Y, Fikrig E. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by

outer surface protein A. *J.Clin.Invest.* 2000; 106: 561-9.

Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, Desilva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 2004a; 119: 457-68.

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* 2004b; 113: 220-30.

Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int J Syst Evol Microbiol* 2020; 70: 5607-12.

Parveen N, Leong JM. Identification of a candidate glycosaminoglycan-binding adhesin of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 2000; 35: 1220-34.

Paul-Ehrlich-Institut. Immunologische Arzneimittel für Hunde. 2022: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/tierarzneimittel/hunde/hunde-liste-1.html>. 2022/05/08.

Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. *Int J Med Microbiol* 2006; 296 Suppl 40: 11-6.

Pfizer Inc. Pfizer and Valneva Initiate Phase 3 Study of Lyme Disease Vaccine Candidate VLA15. 2022: <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-valneva-initiate-phase-3-study-lyme-disease>. 2023/1/26.

Philipp MT, Bowers LC, Fawcett PT, Jacobs MB, Liang FT, Marques AR, Mitchell PD, Purcell JE, Ratterree MS, Straubinger RK. Antibody response to IR₆, a conserved immunodominant region of the VlsE lipoprotein, wanes rapidly after antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* infection in experimental animals and in humans. *J.Infect.Dis.* 2001; 184: 870-8.

Piesman J. Intensity and duration of *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* infectivity in rodent hosts. *International Journal of Parasitology* 1988; 18: 687-9.

Piesman J, Sinsky RJ. Ability to *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis*, and

Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) to acquire, maintain, and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). J Med Entomol 1988; 25: 336-9.

Piesman J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. J Infect Dis 1993; 167: 1082-5.

Piesman J, Schneider BS. Dynamic changes in Lyme disease spirochetes during transmission by nymphal ticks. Exp Appl Acarol 2002; 28: 141-5.

Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. Parasitology 2004; 129 Suppl: S191-220.

Poland GA. Vaccines against Lyme disease: What happened and what lessons can we learn? Clin Infect Dis 2011; 52 Suppl 3: s253-8.

Postal JR, Jeannin PC, Consalvi PJ. Field Efficacy of a Mechanical Pump Spray Formulation Containing 0.25% Fipronil in the Treatment and Control of Flea Infestation and Associated Dermatological Signs in Dogs and Cats. Vet Dermatol 1995; 6: 153-8.

Preac-Mursic V, Weber K, Pfister H-W, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. Infection 1989; 17: 355-9.

Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 1991; 10: 1076-9.

Preyß-Jägeler C, Hartmann K, Dorsch R. [Role of systemic infections in canine kidney diseases]. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2022; 50: 124-36.

Rajput ZI, Hu SH, Chen WJ, Arijo AG, Xiao CW. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. J Zhejiang Univ Sci B 2006; 7: 912-21.

Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anguita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 2005; 436: 573-7.

Ramamoorthy R, Scholl-Meecker D. *Borrelia burgdorferi* proteins whose

expression is similarly affected by culture temperature and pH. *Infect Immun* 2001; 69: 2739-42.

Randolph SE. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by *Ixodid* ticks as vectors. *Parasitology* 2004; 129 Suppl: S37-65.

Rathinavelu S, Broadwater A, de Silva AM. Does host complement kill *Borrelia burgdorferi* within ticks? *Infect.Immun.* 2003; 71: 822-9.

Rauh JJ, Lummis SC, Sattelle DB. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends in Pharmacological sciences* 1990; 11: 325-9.

Raya AI, Afonso JC, Perez-Ecija RA, Blanco B, Martín-de Las Mulas J, Carrasco L, Cortade LE, Gomez-Laguna J. Orbital myositis associated with Lyme disease in a dog. *Vet Rec* 2010; 167: 663-4.

Rezazadegan R, Koushk-Jalali B, Kreuter A. Borrelial Lymphocytoma. *Dtsch Arztebl Int* 2022; 119: 369.

Robert Koch-Institut Lyme-Borreliose 2019:

https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_LymeBorreliose.html. 2023/1/25.

Robertson J, Guy E, Andrews N, Wilske B, Anda P, Granström M, Hauser U, Moosmann Y, Sambri V, Schellekens J, Stanek G, Gray J. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2097-102.

Rohdich N, Roepke RK, Zschiesche E. A randomized, blinded, controlled and multi-centered field study comparing the efficacy and safety of Bravecto (fluralaner) against Frontline (fipronil) in flea- and tick-infested dogs. *Parasit Vectors* 2014; 7: 83.

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.

Rosa PA, Hogan D, Schwan TG. Polymerase chain reaction analyses identify two distinct classes of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 524-32.

Röttgerding F, Wagemakers A, Koetsveld J, Fingerle V, Kirschfink M, Hovius JW, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci Rep* 2017; 7: 303.

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 E, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Jurca T, Logar M, Pikelj-Pecnik A, Strle F. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114: 544-50.

Savadelis MD, Day KM, Bradner JL, Wolstenholme AJ, Dzimianski MT, Moorhead AR. Efficacy and side effects of doxycycline versus minocycline in the three-dose melarsomine canine adulticidal heartworm treatment protocol. *Parasit Vectors* 2018; 11: 671.

Schorderet-Weber S, Noack S, Selzer PM, Kaminsky R. Blocking transmission of vector-borne diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2017; 7: 90-109.

Schulz BS, Hupfauer S, Ammer H, Sauter-Louis C, Hartmann K. Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *Vet Rec* 2011; 169: 229.

Schwan TG, Piesman A, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 1995; 92: 2909-13.

Sethi P, Bruckner JV, Mortuza TB, Cummings BS, Muralidhara S, White CA. Plasma Protein and Lipoprotein Binding of Cis- and Trans-Permethrin and Deltamethrin in Adult Humans and Rats. *Drug Metab Dispos* 2019; 47: 941-8.

Shin SJ, Chang Y-F, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale T-L, 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. *Veterinary Microbiology* 1993; 36: 161-74.

Sicklinger M, Wienecke R, Neubert U. In Vitro Susceptibility Testing of Four Antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a Comparison of Results for the Three Genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto. J.Clin.Microbiol. 2003; 41: 1791-3.

Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Malawista SE, Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. New England Journal of Medicine 1998; 339: 216-22.

Sirotkin MB, Korenberg EI. Influence of Abiotic Factors on Different Developmental Stages of the Taiga Tick *Ixodes persulcatus* and the Sheep Tick *Ixodes ricinus*. Entomological Review 2018; 98: 496-513.

Six RH, Geurden T, Carter L, Everett WR, McLoughlin A, Mahabir SP, Myers MR, Slotmans N. Evaluation of the speed of kill of sarolaner (Simparica™) against induced infestations of three species of ticks (*Amblyomma maculatum*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes ricinus*) on dogs. Vet Parasitol 2016a; 222: 37-42.

Six RH, Becskei C, Mazaleski MM, Fourie JJ, Mahabir SP, Myers MR, Slotmans N. Efficacy of sarolaner, a novel oral isoxazoline, against two common mite infestations in dogs: *Demodex* spp. and *Otodectes cynotis*. Vet Parasitol 2016b; 222: 62-6.

Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, Sikand VK, 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. [Pandora's Box: pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in Central Europe]. Wien Klin Wochenschr 2009; 121: 673-83.

Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 69-79.

Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet* 2012; 379: 461-73.

Stanneck D, Ebbinghaus-Kintscher U, Schoenhense E, Kruedewagen EM, Turberg A, Leisewitz A, Jiritschka W, Krieger KJ. The synergistic action of imidacloprid and flumethrin and their release kinetics from collars applied for ectoparasite control in dogs and cats. *Parasit Vectors* 2012; 5: 73.

Stanneck D, Fourie JJ. Imidacloprid 10 % / flumethrin 4.5 % collars (Seresto®, Bayer) successfully prevent long-term transmission of *Ehrlichia canis* by infected *Rhipicephalus sanguineus* ticks to dogs. *Parasitol Res* 2013; 112 Suppl 1: 21-32.

Steere AC, Batsford WP, Weinberg M, Alexander J, Berger HJ, Wolfson S, Malawista SE. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1980; 93: 8-16.

Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE, Hutchinson GJ, Newman JH, Rahn DW, Sigal LH, Spieler PN, Stenn KS, Malawista SE. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983a; 99: 76-82.

Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JL, Barbour AG, Burgdorfer W, Schmid GP, Johnson J, Malawista SE. The spirochetal etiology of Lyme disease. *New England Journal of Medicine* 1983b; 308: 733-40.

Steere AC, Schoen RT, Taylor E. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann.Intern.Med.* 1987; 107: 725-31.

Steere AC. Lyme disease. *New England Journal of Medicine* 1989; 321: 586-96.

Steere AC, Sikand VK, 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, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J.Clin.Invest* 2004; 113: 1093-101.

Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, Li X, Mead PS. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016; 2: 16090.

Straubinger RK, Chang Y-F, Jacobson RH, Appel MJG. Sera from OspA-vaccinated dogs, but not those from tick-infected dogs, inhibit in vitro growth of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2745-51.

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. *Infection and Immunity* 1997a; 65: 1273-85.

Straubinger RK, Summers BA, Chang Y-F, Appel MJG. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 1997b; 35: 111-6.

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Jacobson RH, Erb HN. Clinical manifestation, pathogenesis, and effect of antibiotic treatment on Lyme borreliosis in dogs. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1998; 110: 874-81.

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. PCR-based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-day postinfection period. *J.Clin.Microbiol.* 2000; 38: 2191-9.

Strle F, Wormser GP. Early Lyme Disease (*Erythema Migrans*) and Its Mimics (Southern Tick-Associated Rash Illness and Tick-Associated Rash Illness). *Infect Dis Clin North Am* 2022; 36: 523-39.

Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhoffer L, Rego ROM. Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83

Tahir D, Asri B, Meyer LN, Evans A, Mather T, Blagburn B, Straubinger RK, Choumet V, Jongejan F, Varloud M. Vectra 3D (dinotefuran, pyriproxyfen and permethrin) prevents acquisition of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis* ticks in an ex vivo feeding model. *Parasit Vectors* 2021; 14: 416.

Takano A, Goka K, Une Y, Shimada Y, Fujita 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. *Environ Microbiol* 2010; 12: 134-46.

Tamagno WA, Alves C, Pompermaier A, Vanin AP, Barcellos LJG. Household prallethrin-based insecticide toxicity on different *C. elegans* life stage: A possible sign of Huntington Disease. *Environ Pollut* 2022; 314: 120301.

Taragel'ová V, Koci J, Hanincová 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. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 1289-93.

Teece S, Crawford I. Towards evidence based emergency medicine: best BETs from the Manchester Royal Infirmary. How to remove a tick. *Emerg Med J* 2002; 19: 323-4.

Tilly K, Krum JG, Bestor A, Jewett MW, Grimm D, Bueschel D, Byram R, Dorward D, Vanraden MJ, Stewart P, Rosa P. *Borrelia burgdorferi* OspC protein required exclusively in a crucial early stage of mammalian infection. *Infect Immun* 2006; 74: 3554-64.

Timcke M-L, Pätzold A, Wendler D, Flik I, Möller C, Eckwert L. ZECKEN-ATLAS 2022

Wo sich Zecken in Deutschland festsaugen. 2022: <https://interaktiv.abendblatt.de/zecken-atlas-deutschland/>. 2022/07/24.

Tingle CC, Rother JA, Dewhurst CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 2003; 176: 1-66.

Topfer K, Straubinger RK. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent - A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Praktische Tierarzt* 2006; 87: 430-+.

Trevisan G, Nan K, di Meo N, Bonin S. The Impact of Telemedicine in the Diagnosis of *Erythema Migrans* during the COVID Pandemic: A Comparison with In-Person Diagnosis in the Pre-COVID Era. *Pathogens* 2022; 11

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

Tufts DM, Hart TM, Chen GF, Kolokotronis SO, Diuk-Wasser MA, Lin YP. Outer surface protein polymorphisms linked to host-spirochete association in Lyme borreliae. *Mol Microbiol* 2019; 111: 868-82.

Urbanowicz A, Lewandowski D, Szpotkowski K, Figlerowicz M. Tick receptor for outer surface protein A from *Ixodes ricinus* - the first intrinsically disordered protein involved in vector-microbe recognition. *Sci Rep* 2016; 6: 25205.

Van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, De Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar ACP, Kramer MD, Dankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 17: 708-17.

van Dam AP. Diversity of Ixodes-borne Borrelia species--clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002; 2: 249-54.

Van Hoecke C, Lebacq E, Beran J, Parenti D. Alternative vaccination schedules (0, 1, and 6 months versus 0, 1, and 12 months) for a recombinant OspA Lyme disease vaccine. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1260-4.

Vassallo M, Pichon B, Cabaret J, Figureau C, Pérez-Eid C. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the principal vector of Lyme disease in Europe. *J Med Entomol* 2000; 37: 335-9.

Vladimirov LN, Machaktyrov GN, Machaktyrova VA, Louw AS, Sahu N, Yunus AP, Avtar R. Quantifying the Northward Spread of Ticks (Ixodida) as Climate Warms in Northern Russia. *Atmosphere* 2021; 12: 233.

Vogt NA, Stevens CPG. Why the Rationale for Canine *Borrelia burgdorferi* Vaccination Is Unpersuasive. *Front Vet Sci* 2021; 8: 719060.

Vörös K, Becker Z, Kónya R, Arany-Tóth A, Farkas R. Application of Moxidectin and Ultrasound-Aided Injection of Melarsomine During the American Heartworm Society Recommended Treatment Protocol in *Dirofilaria immitis* Infected Dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2022; 22: 382-90.

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.

Wagner B, Johnson J, Garcia-Tapia D, Honsberger N, King V, Strietzel C, Hardham JM, Heinz TJ, Marconi RT, Meeus PF. Comparison of effectiveness of cefovecin, doxycycline, and amoxicillin for the treatment of experimentally induced early Lyme borreliosis in dogs. *BMC Vet Res* 2015; 11: 163.

Wang G, Wormser GP, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi*. In: *Molecular medical microbiology* Sussman M, ed. London, United Kingdom: Academic Press 2001: 2059-92.

Wang G, Iyer R, Bittker S, Cooper D, Small J, Wormser GP, Schwartz I. Variations in Barbour-Stoenner-Kelly culture medium modulate infectivity and pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infect Immun* 2004; 72: 6702-6.

Weber R. [The Less Frequent Tick-borne Infections in Central Europe]. *Ther Umsch* 2022; 79: 426-40.

Whittemore JC, Moyers TD, Price JM. Randomized, controlled, crossover trial of prevention of antibiotic-induced gastrointestinal signs using a synbiotic mixture in healthy research dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1619-26.

Wilczek CK, Wenderlein J, Hiereth S, Straubinger RK. A Retrospective Study with a Commercial Vaccine against Lyme Borreliosis in Dogs Using Two Different Vaccination Schedules: Characterization of the Humoral Immune Response. *Vaccines (Basel)* 2022; 11

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

Wilson AL, Courtenay O, Kelly-Hope LA, Scott TW, Takken W, Torr SJ, Lindsay SW. The importance of vector control for the control and elimination of vector-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14: e0007831.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-71.

Wolcott KA, Margos G, Fingerle V, Becker NS. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: A review. *Ticks Tick Borne Dis* 2021; 12: 101766.

Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 1089-134.

Wormser GP, Brisson D, Liveris D, Hanincová K, Sandigursky S, Nowakowski J, Nadelman RB, Ludin S, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *J Infect Dis* 2008; 198: 1358-64.

Wormser GP, Schwartz I. Antibiotic treatment of animals infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 387-95.

Wright DJ. Borrel's accidental legacy. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15: 397-9.

Wu J, Weening EH, Faske JB, Höök M, Skare JT. Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires $\beta(1)$ integrins and Src kinase activity. *Infect Immun* 2011; 79: 1338-48.

Yeung C, Baranchuk A. Diagnosis and Treatment of Lyme Carditis: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* 2019; 73: 717-26.

Zajkowska J, Czupryna P, Pancewicz SA, Kondrusik M, Moniuszko A. *Acrodermatitis chronica atrophicans*. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 800.

Zerba E. Insecticidal activity of pyrethroids on insects of medical importance. *Parasitol Today* 1988; 4: S3-7.

Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic 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*. *Infect.Immun.* 1998; 66: 3689-97.

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

Zhou X, Hohman AE, Hsu WH. Current review of isoxazoline ectoparasitocides used in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther* 2022; 45: 1-15.

Zlotkin E. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu Rev Entomol* 1999; 44: 429-55.

Zückert WR. A call to order at the spirochaetal host-pathogen interface. *Mol Microbiol* 2013; 89: 207-11.

VIII. ANHANG

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jan 26, 2023

This Agreement between Ms. Claudia Wilczek ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5476530261524
License date	Jan 26, 2023
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed Content Title	Interactions between <i>Borrelia burgdorferi</i> and ticks
Licensed Content Author	Cheyne Kurokawa et al
Licensed Content Date	Jul 10, 2020
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no

Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Charakterisierung der humoralen Immunantwort von Hunden nach Impfung gegen die Lyme-Borreliose anhand zwei verschiedener Impfstrategien
Institution name	LMU Munich
Expected presentation date	Sep 2023
Portions	Figure 2
Requestor Location	Ms. Claudia Wilczek Zum Roßbusch 10a Ammerthal, 92260 Germany Attn: LMU Munich
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Abbildung A 1: Nutzungsrecht für Abbildung 3

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 28, 2023

This Agreement between Ms. Claudia Wilczek ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5477580157010
License date	Jan 28, 2023
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Microbiology
Licensed Content Title	Interactions between <i>Borrelia burgdorferi</i> and ticks
Licensed Content Author	Cheyne Kurokawa et al
Licensed Content Date	Jul 10, 2020
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no

Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Charakterisierung der humoralen Immunantwort von Hunden nach Impfung gegen die Lyme-Borreliose anhand zwei verschiedener Impfstrategien
Institution name	LMU Munich
Expected presentation date	Sep 2023
Portions	Figure 4
Requestor Location	Ms. Claudia Wilczek Zum Roßbusch 10a Ammerthal, 92260 Germany Attn: LMU Munich
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Abbildung A 2: Nutzungsrecht für Abbildung 4

IX. DANKSAGUNG

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Straubinger, der diese Arbeit möglich gemacht hat und mir trotz 200 km Entfernung jederzeit unterstützend und beratend zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Theo Mantel möchte ich ebenfalls von ganzem Herzen danken, dass er mir eines Abends in den Räumen der Bayrischen Tierärztekammer seine Zeit schenkte und mir diese Möglichkeit eröffnete.

Allen Hundebesitzern danke ich für das Vertrauen und die Bereitschaft, die sie mir entgegengebracht haben. Herrn Dr. Ingo Dübeler danke ich ebenfalls für die Bereitschaft und Unterstützung dieser Arbeit als auch die tägliche Zusammenarbeit. Meiner Kollegin und Freundin Hanni gilt ebenso mein großer Dank für alles, was wir in den letzten Jahren zusammen erlebt haben.

Auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bakteriologie und Mykologie der veterinärmedizinischen Fakultät der LMU München gilt mein Dank, dass ich herzlich aufgenommen wurde und mir bei allen kleinen oder größeren Problemen stets geholfen wurde. Ganz besonders danke ich Stephanie Hiereth, die mir mit ihrer so kompetenten und lieben Art die Freuden der Laborarbeit nahegebracht hat und mir stets im Labor zur Seite stand. Auch Dr. Jasmin Wenderlein möchte ich von ganzem Herzen danken. Sie war mir nicht nur eine Stütze und große Hilfe in jeglichen Fragestellungen rund um diese Arbeit, sondern hat auch nie das Zwischenmenschliche vergessen.

Danke auch an Karl-Otto, für die Hilfe bei jeglichen graphischen und technischen Fragen und Anforderungen! Meiner Mutter und meiner Schwester danke ich für die immerwährende Unterstützung, komme was wolle. Danke auch an Franz, dass du stets an meiner Seite bist. Und zuletzt danke, Coco und Saba. *Der Hund blieb mir im Sturme treu, der Mensch nicht mal im Winde* (Franz von Assisi).