

**Vergleich zweier Line-Immunoassays zum Nachweis von
spezifischen Antikörpern sowie Etablierung und Testung
eines Line-Immunoassays zum Nachweis speziesspezifischer
Antikörper gegen Erreger des *Borrelia-burgdorferi*-sensu-
lato-Komplexes in caninen und equinen Seren**

von Sophie Charlotte Doff, geb. d'Heureuse

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

**Vergleich zweier Line-Immunoassays zum Nachweis von
spezifischen Antikörpern sowie Etablierung und Testung
eines Line-Immunoassays zum Nachweis speziesspezifischer
Antikörper gegen Erreger des *Borrelia-burgdorferi*-sensu-
lato-Komplexes in caninen und equinen Seren**

von Sophie Charlotte Doff, geb. d'Heureuse
aus Bad Reichenhall

München 2025

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: Prof. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 08.02.2025

Für Bini, Emmi und Maxi

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1	Der <i>Borrelia-burgdorferi-sensu-lato</i>-Komplex	3
1.1	Taxonomie und Nomenklatur	3
1.2	Morphologische Eigenschaften	5
1.3	Oberflächenstruktur und Pathogenitätsmechanismen der Borrelien	6
2	Lyme-Borreliose.....	10
2.1	Infektionsmechanismus	10
2.2	Immunantwort des Wirtes	12
2.3	Lyme-Borreliose in der Veterinärmedizin.....	13
2.3.1.1	Lyme-Borreliose der Hunde	13
2.3.1.2	Lyme-Borreliose der Pferde	15
2.4	Therapie der Lyme-Borreliose.....	17
3	Nachweis der Borrelien-Infektion.....	19
3.1	Direkte Nachweisverfahren	19
3.1.1	Kultivierung.....	19
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	20
3.2	Indirekte Nachweisverfahren.....	21
3.2.1	Zweistufentest zum Nachweis spezifischer Antikörper	21
3.2.1.1	ELISA	22
3.2.1.2	KELA	22
3.2.1.3	Immunoblot	23
3.2.1.4	Western-Blot.....	23
3.2.1.5	Line-Immunoassay	24
3.2.2	Immunfluoreszenztest.....	25
3.2.3	C ₆ -Peptid-Schnelltest.....	26
3.2.4	Lyme Multiplex Assay	26
3.2.5	Lymphozyten-Transformationstest.....	27
3.2.6	ELISPOT	28
III.	PUBLIKATION.....	30
IV.	WEITERE FORSCHUNGEN	50

1	Material und Methoden	50
1.1	Infektionsmechanismus	50
1.2	Speziesdifferenzierung mithilfe des entwickelten LIA	51
2	Ergebnisse	52
2.1	Murine Serumproben.....	52
2.2	Canine Seren.....	54
2.3	Equine Seren.....	56
3	Diskussion der Ergebnisse der weiteren Forschungen.....	59
V.	DISKUSSION	62
1	Sensitivität, Spezifität und Ergebnisse der LIAs zur Diagnostik einer Borrelien-Infektion.....	63
2	Handhabung der LIAs zum Nachweis einer Borrelieninfektion	69
3	Diskussion der Ergebnisse der Forschung zur Speziesdifferenzierung.....	74
VI.	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
VII.	SUMMARY.....	79
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	80
IX.	ANHANG	124
X.	DANKSAGUNG	129

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ap	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
B.	<i>Borrelia</i>
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
Bbss	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
BmpA	<i>Borrelia membrane protein A</i>
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly
CO	Cut-Off
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DbpA	<i>Decorin binding protein A</i>
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbant-Assay
ELISPOT	Enzyme-Linked-Immunospot-Assay
EM	<i>erythema migrans</i>
IFAT	Immunfluoreszenztest
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IR	<i>invariable region</i>
kDa	Kilodalton
KELA	Kinetischer Enzyme-Linked-Immunsorbant-Assay
LB	Lyme-Borreliose
LIA	Line-Immunoassay
LMA	Lyme Multiplex Assay
LTT	Lymphozyten-Transformationstest
MFI	<i>median fluorescent intensities</i>
MKP	Modified-Kelly-Pettenkofer
OD	Optische Dichte

Osp	<i>Outer surface protein</i>
p	Protein
p. i.	<i>post infectionem</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
RF	Rückfallfieber
RNA	Ribonukleinsäure
SPF	spezifisch-pathogenfrei
STTT	<i>standard two-tiered serologic testing</i>
TLR-2	toll-like-receptor-2
TROSPA	<i>tick receptor for OspA</i>
VBNC	<i>viable-but-nonculturable</i>
VlsE	<i>variable major protein-like sequence, expressed</i>
VR	<i>variable region</i>
WB	Westernblot

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Geographische Verteilung der Borrelienspezies (GUÉRIN <i>et al.</i>, 2023).....	4
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung von <i>B. burgdorferi</i>	5
Abbildung 3: Mikroskopische und schematische Darstellung von <i>B. burgdorferi</i> (ROSA <i>et al.</i>, 2005)	6
Abbildung 4: Aufnahme von <i>B. burgdorferi</i> aus einem infizierten Wirt in eine Zecke (KUROKAWA <i>et al.</i>, 2020)	10
Abbildung 5: Übertragung von <i>B. burgdorferi</i> von der Zecke auf den Wirt (KUROKAWA <i>et al.</i>, 2020)	11
Abbildung 6: Auswertung der murinen Seren im Spezies-LIA	53
Abbildung 7: Auswertung der caninen Kontrollseren der Cornell University im Spezies-LIA	54
Abbildung 8: Auswertung der caninen Feldseren im Spezies-LIA.....	56
Abbildung 9: Auswertung der equinen Seren im Spezies-LIA	58
Abbildung 10: Inkubation von Serum auf dem Kippschüttler	70
Abbildung 11: Trocknen der fertigen Streifen auf Zellulosetüchern	70
Abbildung 12: Beispielbild eines gesprenkelten Streifens des LIA A	73
Abbildung 13: Beispiel eines nicht-verfärbten (oben) und verfärbten (unten) Streifens des LIA B.....	73

ABBILDUNGSVERZEICHNIS ANHANG

Abbildung A 1: Inhalt des Testkits des LIA A	124
Abbildung A 2: Inhalt des Testkits des LIA A	125
Abbildung A 3: Inhalt des Testkits des LIA B	125
Abbildung A 4: Inhalt des Testkits des LIA B für Pferdeseren	126
Abbildung A 5: Nutzungsrecht für Abbildungen 4 und 5.....	128

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Liste der Borrelien des <i>B.-burgdorferi-sensu-lato</i>-Komplexes	3
--	----------

I. EINLEITUNG

Lyme-Borreliose (LB) zählt sowohl in Europa als auch in den Vereinigten Staaten zu einer der am häufigsten durch Vektoren übertragenen Krankheiten (WU *et al.*, 2011). Ursächlich für diese multisystemische Erkrankung sind Spirochäten des *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato* (*Bbsl*)-Komplexes, welchem mittlerweile über 20 Borrelienspezies angehören (CUTLER *et al.*, 2017). Übertragen werden die Spirochäten während des Saugaktes von Zecken, wobei in Europa *Ixodes ricinus* – auch bekannt als Gemeiner Holzbock – als Überträger fungiert (SKOTARCZAK *et al.*, 2003; WODECKA, 2003; LOMMANO *et al.*, 2012). Die Spezies *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *Borrelia* (*B.*) *garinii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii* und *B. afzelii* werden am häufigsten mit humanen Erkrankungen assoziiert (BARANTON *et al.*, 1992; CANICA *et al.*, 1993; GERN & HUMAIR, 2002; PIESMAN & GERN, 2004; FINGERLE *et al.*, 2008; STANEK & REITER, 2011; MANNELLI *et al.*, 2012; STANEK *et al.*, 2012; STUPICA *et al.*, 2015). Die Humanpathogenität von *B. lusitanae*, *B. miyamotoi* und *B. valaisiana* konnte durch deren Nachweis in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) verifiziert werden (COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2004; DIZA *et al.*, 2004; DE CARVALHO *et al.*, 2008; HOVIUS *et al.*, 2013). Zusätzlich zum Menschen können diese Spirochäten auch bei anderen Säugetieren, wie Hunden und Pferden, Erkrankungen auslösen. Klinische Anzeichen sind bei diesen beiden Tierarten unspezifisch und treten – wenn überhaupt – eher im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit auf (LISSMAN *et al.*, 1984; APPEL *et al.*, 1993; HAHN *et al.*, 1996; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; PASSAMONTI *et al.*, 2015). Sowohl in der Human- als auch in der Tiermedizin ist der diagnostische Goldstandard ein Zweistufenverfahren (STEERE *et al.*, 2008; BARTH *et al.*, 2014). Hierbei dient z.B. ein kinetischer Enzyme-linked-Immunosorbant-Assay (KELA) als erste Stufe. Dabei wird der spezifische Immunglobulin (Ig)-G-Antikörperspiegel quantitativ gemessen, wobei die Probe bei Werten über 100 als Borrelien-positiv gilt. Der KELA zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus, kann aber zwischen geimpften und infizierten Patienten nicht unterscheiden. Um diese Unterscheidung zu ermöglichen, fungiert der Line-Immunoassay (LIA) als zweiter Schritt der Diagnostik. Die hohe Spezifität des LIA wird durch verschiedene Ag-Signale erreicht, die eine Unterscheidung zwischen Impfung und Infektion ermöglichen (WILSKE *et al.*, 2007). In der Humanmedizin gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass verschiedene Borrelienspezies eine

unterschiedliche Symptomatik verursachen. So wird beispielsweise *B. spielmanii* mit *Erythema migrans* (EM) assoziiert, für *B. afzelii* konnte eine höhere Affinität zu Kollagen in der Haut als bei anderen Spezies nachgewiesen werden (FINGERLE *et al.*, 2008; STUPICA *et al.*, 2015). Bei Hunden wurde bisher unter Laborbedingungen nur die Pathogenität von *Bbss* bewiesen (STRAUBINGER *et al.*, 1998a). Aufgrund der steigenden Anzahl an Borrelienspezies, die mit humanen Erkrankungen assoziiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass auch bei Tieren neben *Bbss* zusätzliche Spezies eine LB verursachen können. Bisherige Untersuchungen hierzu wurden fast ausschließlich mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und anschließender Gensequenzierung durchgeführt, dies stellt auf Grund möglicher falsch-negativer Ergebnisse jedoch kein sicheres Verfahren dar (STRAUBINGER *et al.*, 1998a; STRAUBINGER, 2000; SPECK *et al.*, 2007; LESCHNIK *et al.*, 2013; NUNES *et al.*, 2018; OKEYO *et al.*, 2019).

Ziel dieser Arbeit war es, zwei für Hunde und Pferde zugelassene kommerzielle LIAs (im Weiteren LIA A und LIA B) hinsichtlich der Korrektheit und Vergleichbarkeit der daraus gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen. Die so gewonnenen Ergebnisse sollen zu einer optimierten Diagnose der LB bei Hunden und Pferden beitragen. Ein weiteres Ziel war, neue Erkenntnisse bezüglich der für diese Tierarten pathogenen Borrelienspezies mittels speziesspezifischem Antikörpernachweis zu gewinnen. Dafür wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Virotech (VIROTECH Diagnostics GmbH, Rüsselsheim, Deutschland) ein LIA entwickelt, mit welchem fünf verschiedene Borrelienspezies anhand von Antigen-Antikörper-Bindung unterschieden werden sollen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1 Der *Borrelia-burgdorferi-sensu-lato*-Komplex

1.1 Taxonomie und Nomenklatur

Namensgebend für Borrelien war der französische Bakteriologe Amédée Borrel (1867-1936) (BRADE & HUNFELD, 2009). Die Gattung *Borrelia* gehört zur Familie der Borreliaceae, welche dem Stamm der Spirochaetota zugeordnet wird (PARTE *et al.*, 2020). Nach momentanem Kenntnisstand gehören 21 Spezies zum *Bbsl*-Komplex (Tabelle 1); dieser Gruppe werden auch die Erreger der LB zugeordnet (WOLCOTT *et al.*, 2021).

Tabelle 1: Liste der Borrelien des *B.-burgdorferi-sensu-lato*-Komplexes

Name	Humanpathogenität	Referenz
<i>B. afzelii</i>	bewiesen	(CANICA <i>et al.</i> , 1993)
<i>B. americana</i>	ungeklärt	(RUDENKO <i>et al.</i> , 2009b)
<i>B. andersonii</i>	nein	(MARCONI <i>et al.</i> , 1995)
<i>B. bavariensis</i>	bewiesen	(MARGOS <i>et al.</i> , 2009)
<i>B. bissettii</i>	ungeklärt	(POSTIC <i>et al.</i> , 1998)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	bewiesen	(JOHNSON <i>et al.</i> , 1984b)
<i>B. californiensis</i>	ungeklärt	(POSTIC <i>et al.</i> , 2007)
<i>B. carolinensis</i>	nein	(RUDENKO <i>et al.</i> , 2009a)
<i>B. chilensis</i>	ungeklärt	(IVANOVA <i>et al.</i> , 2014)
<i>B. finlandensis</i>	ungeklärt	(CASJENS <i>et al.</i> , 2011)
<i>B. garinii</i>	bewiesen	(BARANTON <i>et al.</i> , 1992)
<i>B. japonica</i>	nein	(KAWABATA <i>et al.</i> , 1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	ungeklärt	(MARGOS <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. lusitaniae</i>	ungeklärt	(LE FLECHE <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. mayonii</i>	ungeklärt	(PRITT <i>et al.</i> , 2016)
<i>B. sinica</i>	ungeklärt	(MASUZAWA <i>et al.</i> , 2001)

<i>B. spielmanii</i>	bewiesen	(RICHTER <i>et al.</i> , 2006)
<i>B. tanukii</i>	ungeklärt	(FUKUNAGA <i>et al.</i> , 1996)
<i>B. turdi</i>	ungeklärt	(FUKUNAGA <i>et al.</i> , 1996)
<i>B. valaisiana</i>	bewiesen	(WANG <i>et al.</i> , 1997)
<i>B. yangtzensis</i>	ungeklärt	(CHU <i>et al.</i> , 2008)

Die einzelnen Spezies unterscheiden sich zum Teil in Wirtsspezifität, Verbreitung und Organtropismus (MARGOS *et al.*, 2011; CUTLER *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu *Bbss*, welches auf allen Kontinenten aufzufinden ist, sind in Nordamerika andere Spezies vertreten als in Europa oder Asien (siehe Abb. 1).

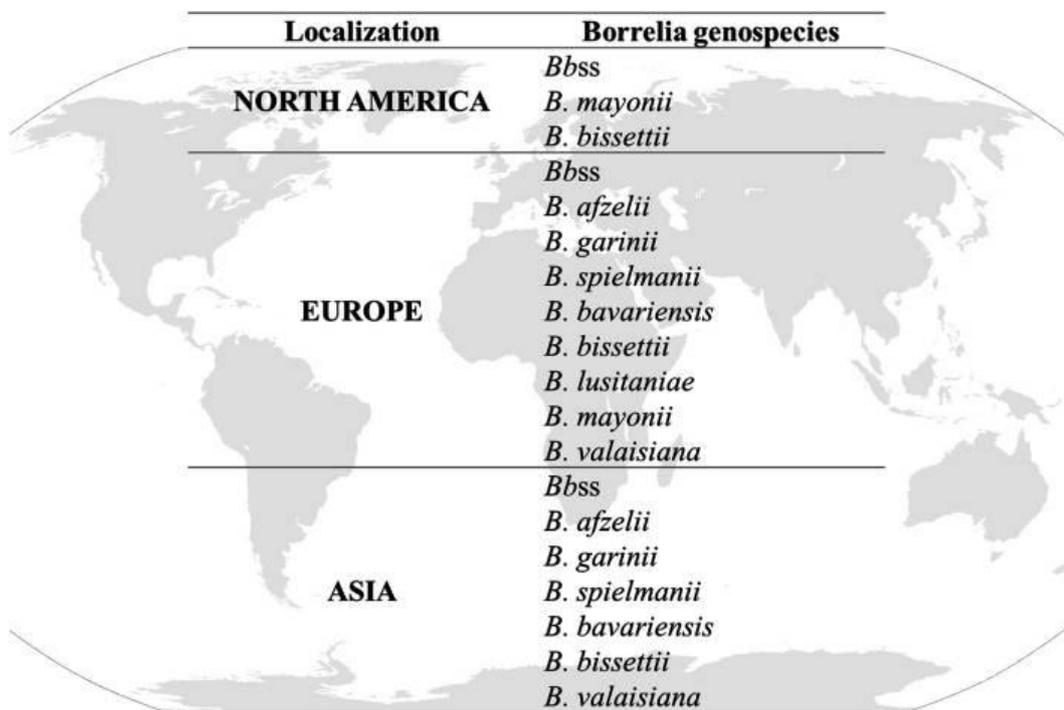


Abbildung 1: Geographische Verteilung der Borrelienspezies (GUÉRIN *et al.*, 2023)

Als nachweislich humanpathogen gelten *Bbss* (JOHNSON *et al.*, 1984b), *B. garinii* (BARANTON *et al.*, 1992), *B. afzelii* (CANICA *et al.*, 1993) und *B. bavariensis* (MARKOWICZ *et al.*, 2015). Durch den Nachweis von *B. spielmanii* im EM mehrerer Patienten kann von dessen Beteiligung an klinischen Hautmanifestationen bei der LB ausgegangen werden (FOLDVARI *et al.*, 2005; MARASPIN *et al.*, 2006; FINGERLE *et al.*, 2008). Zudem wird die Pathogenität von *B. lusitanae* und *B. valaisiana* vermutet; ersteres konnte aus einer chronischen Hautläsion isoliert werden (COLLARES-PEREIRA *et al.*, 2004) und wurde mit einer Vaskulitis

ähnlichen Syndrom in Zusammenhang gebracht (DE CARVALHO *et al.*, 2008). Der Nachweis von *B. valaisiana* gelang aus der CSF eines Mannes mit spastischer Paraparese (DIZA *et al.*, 2004). In mehreren, vor allem südlichen Staaten der USA konnte die DNA von *B. andersonii* und *B. americana* in Blut- und Hautproben von Patienten mit für LB typischen Symptomen nachgewiesen werden (CLARK *et al.*, 2014), auch die Pathogenität von *B. japonica* wird vermutet (MASUZAWA *et al.*, 1996b). Zudem wurde in den Vereinigten Staaten eine neue Spezies, *B. mayonii*, aus der Haut bzw. CSF von sechs Patienten mit LB isoliert. Diese Borrelienspezies zeichnet sich durch eine hohe Virulenz aus und verursacht eine größere Spirochätämie als andere Spezies (PRITT *et al.*, 2016).

1.2 Morphologische Eigenschaften

Die mikroaerophilen, gramnegativen Borrelien stellen sich als helikal gewundene, bewegliche Bakterien dar (Abb. 2).

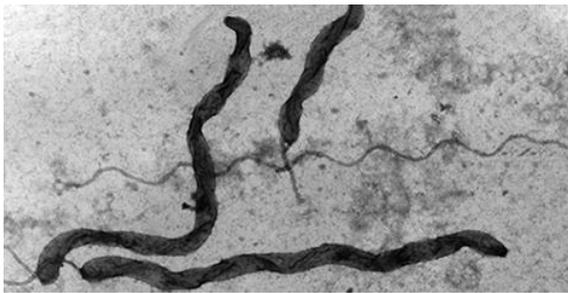


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Darstellung von *B. burgdorferi*

(nach dem Robert-Koch-Institut (RKI) (ROBERT KOCH INSTITUT, 2019))

Die verschiedenen Borrelienspezies unterscheiden sich morphologisch hinsichtlich Länge, Durchmesser, Gleichmäßigkeit und Enge der Windungen; ebenso kann die Anzahl der periplasmatischen Flagellen variieren (BARBOUR & HAYES, 1986). Borrelien haben eine Länge von 10 bis 30 μm , der Zelldurchmesser variiert zwischen 0,18 bis 0,25 μm (BURGDORFER *et al.*, 1982; JOHNSON *et al.*, 1984a). Je näher die Bakterien an die stationäre Wachstumsphase kommen, desto größer sind sie; ebenso wird ihre Größe vom zur Anzucht verwendeten Kulturmedium beeinflusst (ARISTOWSKY & HOELTZER, 1924; BARBOUR & HAYES, 1986). Im Inneren des Protoplasmazyinders liegt neben den Zellorganellen das lineare Chromosom, welches aus über 910.000 Basenpaaren sowie neun zirkulären und zwölf linearen Plasmiden besteht (FRASER *et al.*, 1997). Die Plasmide setzen sich aus insgesamt über 530.000 Basenpaaren zusammen und bilden das größte, bisher

in charakterisierten Bakterien nachgewiesene DNA-Komplement (FRASER *et al.*, 1997; CASJENS *et al.*, 2005; STEWART *et al.*, 2005). Zusätzliche Gensignaturen der einzelnen Borrelienspezies spielen nach neuesten Erkenntnissen eine Rolle bei der Verteilung und der Infektiosität der Spirochäten innerhalb des Wirts (LEMIEUX *et al.*, 2023). Die Fortbewegung der Borrelien wird durch im periplasmatischen Raum befindliche Endoflagellen bewerkstelligt. Dabei inserieren bis zu 18 in Bündeln liegende Endoflagellen an den Basalkörpern beider Pole und durchziehen den periplasmatischen Raum asymmetrisch (Abb. 3). Die Kontraktion dieser Endoflagellenbündel führt zur Kontraktion des Protoplasmazyinders und in der Folge einer schraubenförmigen Fortbewegung. Um den Zellkörper vor äußeren Einflüssen zu schützen, umgibt ihn die wasserlösliche, muköse Außenmembran (*surface layer*) (Abb. 3) (JOHNSON *et al.*, 1984a; BARBOUR & HAYES, 1986; CHARON & GOLDSTEIN, 2002).

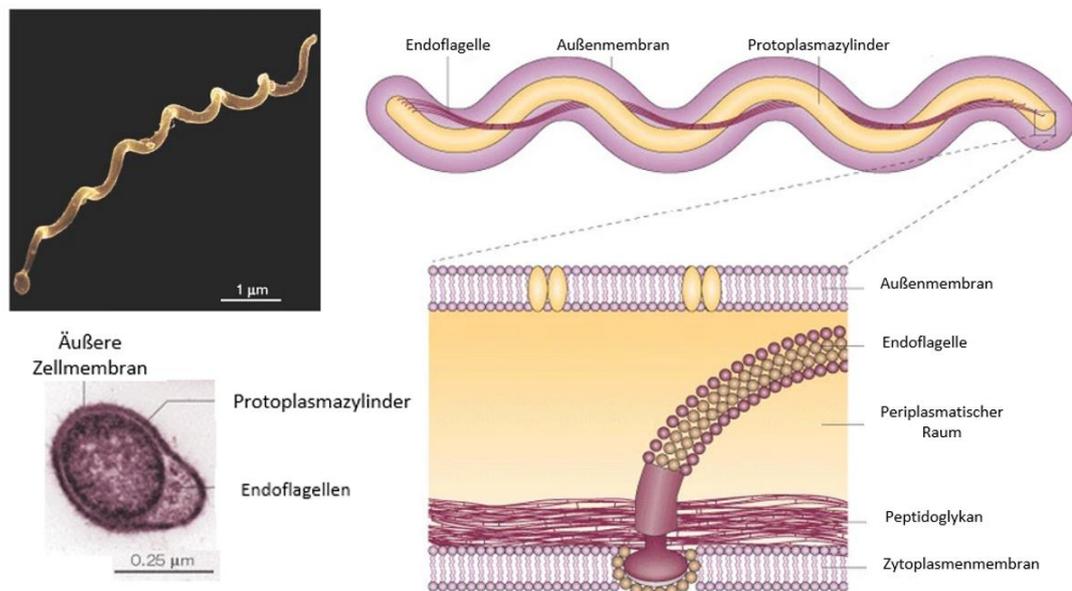


Abbildung 3: Mikroskopische und schematische Darstellung von *B. burgdorferi* (ROSA *et al.*, 2005)

1.3 Oberflächenstruktur und Pathogenitätsmechanismen der Borrelien

Auf Grund der Fokussierung dieser Arbeit hinsichtlich der Validierung und Entwicklung diagnostischer Tests zum Antigennachweis soll in diesem Kapitel nur auf für die Diagnostik relevante Oberflächenproteine eingegangen werden. Ein Review zu diesen und anderen Proteinen der Spirochäten haben Winslow und Coburn im Jahr 2019 veröffentlicht (WINSLOW & COBURN, 2019). Eine Besonderheit der Borrelien im Vergleich zu anderen Pseudomonadota sind die

Anzahl und Variabilität der Lipoproteine auf ihrer äußeren Membran (SAMUELS & RADOLF, 2010). Vor allem die Oberflächenproteine (*Outer surface protein*, Osp) der Spirochäten sind hochvariable Antigene (Ag) und haben starken Einfluss auf die Pathogenität (STEVENSON *et al.*, 1995; BONO *et al.*, 1998; STEVENSON *et al.*, 1998; PORCELLA *et al.*, 2000). Ihrem Molekulargewicht entsprechend werden sie in die Gruppen OspA bis OspF eingeteilt und weisen eine hohe Heterogenität vor allem bei humanpathogenen Borrelienspezies auf (WILSKE *et al.*, 1992; WILSKE *et al.*, 1993b; JAURIS-HEIPKE *et al.*, 1995). Mithilfe des OspA gelingt der Borrelie die Adhäsion an die Darmwand der Zecke. Nach dem Saugakt steigt die Temperatur im Mitteldarm des Vektors, der pH-Wert sinkt von 7,2 bis 7,6 auf 6,8 bis 6,9 (BALASHOV, 1967; YANG *et al.*, 2000; RAMAMOORTHY & SCHOLL-MEEKER, 2001). Aufgrund dieser wechselnden Bedingungen wird statt OspA nun OspC exprimiert (FINGERLE *et al.*, 1995; SCHWAN *et al.*, 1995; STEVENSON *et al.*, 1995). Die Expression des OspC erreicht ihren Höhepunkt 48 Stunden nach Beginn des Saugaktes (SCHWAN & PIESMAN, 2000). Dies veranlasst zur Vermutung, dass dieses Oberflächenprotein für die Diagnose einer frühen Borrelieninfektion von Bedeutung sein könnte (WILSKE *et al.*, 1988; WILSKE *et al.*, 1989). Das OspC weist eine hohe Affinität zur Speicheldrüse der Zecke auf und hat somit großen Einfluss auf die Übertragung der Borrelie mit dem Speichel auf den Wirt (GILMORE & PIESMAN, 2000; PAL *et al.*, 2004b). Um dem Immunsystem des Wirts zu entkommen, exprimieren Borrelien die Proteine während einer Infektion weniger auf ihrer Oberfläche, wodurch nur bedingt Ak gegen sie gebildet werden können. Im Gegenzug steigt die Expression von anderen Oberflächenproteinen wie z.B. variable major protein like sequence expressed (VlsE) und dem *Borrelia-burgdorferi*-arthritis-related-protein (COX *et al.*, 1996; LIANG *et al.*, 2002a; LIANG *et al.*, 2002b; LIANG *et al.*, 2004).

Ein weiteres Oberflächenprotein, mit dessen Hilfe Borrelien dem Immunsystem des Wirtes entkommen, ist das VlsE. Dieses Lipoprotein hat eine Größe von 34 kDa und wird nahe des rechten Telomers des linearen Plasmids exprimiert; vermutlich ist es mittels Lipidankern mit der Borrelienmembran verbunden (ZHANG *et al.*, 1997; LIANG *et al.*, 1999a). Die Besonderheit des VlsE liegt in seinen invariablen (IR₁-IR₆) und variablen (VR₁-VR₆) Regionen, welche von zwei konstanten Domänen flankiert werden (EICKEN *et al.*, 2002). Separat hervorzuheben ist hier die 26-mer *invariable region* (IR₆), da Ak gegen diese nur bei aktiven Infektionen

gebildet werden. Dies macht die IR₆ vor allem für die Diagnostik der LB wertvoll (ZHANG *et al.*, 1997; ZHANG & NORRIS, 1998b; LIANG *et al.*, 2000; PHILIPP *et al.*, 2001). Die Expression dieses Gens und damit die Produktion des VlsE unterscheidet sich in verschiedenen Geweben (BYKOWSKI *et al.*, 2006) und ermöglicht den Borrelien den *immune-escape*-Mechanismus, wodurch eine persistierende Infektion entstehen kann. Um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, rekombinieren einzelne Teile der *vls*-Genkassetten mit Segmenten der Zentraldomäne, wodurch immer wieder neue Ag synthetisiert werden. Dieser Prozess beginnt bereits am vierten Tag nach einer Infektion (ZHANG & NORRIS, 1998a). Da die IR des VlsE-Proteins nicht auf der Oberfläche der Spirochäten exponiert sind, können die vom Säugerwirt gebildeten Ak kaum an die Epitope binden, wodurch die Eliminierung der Spirochäten erschwert wird (ZHANG & NORRIS, 1998a; LIANG *et al.*, 1999a; EICKEN *et al.*, 2002; EMBERS *et al.*, 2007; ROGOVSKYY *et al.*, 2015).

Von diagnostischer Bedeutung ist auch das *Borrelia membrane protein A* (BmpA), ein membranassoziiertes Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kDa (SIMPSON *et al.*, 1990). Dieses bindet an Laminine und spielt somit eine wichtige Rolle für den Stoffwechsel der Borrelien im Säugermechanismus sowie bei der Entstehung der Lyme-Arthritis (PAL *et al.*, 2008; VERMA *et al.*, 2009).

Ein weiteres diagnostisch wertvolles Protein ist das *Decorin binding protein A* (DbpA). Dieses auf der äußeren Membran der Borrelien lokalisierte Protein wird aufgrund seines Molekulargewichtes von 17-18 kDa auch Osp17 oder p18 genannt. Durch seine Fähigkeit, Dekorin zu binden, spielt es eine maßgebende Rolle bei der Anheftung der Borrelie an Kollagenfasern in der Haut und anderen Geweben (GUO *et al.*, 1995). DbpA wird *in vivo* exprimiert und ist vor allem bei fortgeschrittenen Infektionen nachweisbar (CASSATT *et al.*, 1998; HAUSER *et al.*, 1998; JAURIS-HEIPKE *et al.*, 1999).

Eine hohe Variabilität des Molekulargewichts weist das p83/100-Protein auf, welches auch „Protein im 100 kDa-Bereich“ genannt wird (WILSKE *et al.*, 1992; RÖSSLER *et al.*, 1995). Dieses immundominante Protein ist im protoplasmatischen Zylinder lokalisiert und zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für Bbs1 aus (BRUCKBAUER *et al.*, 1992; LUFT *et al.*, 1992). Das p83/100 könnte ähnliche Funktionen wie das flagellenassoziierte Protein p41 haben, da es bei Aufreinigungsschritten von Borrelienproteinen häufig in derselben Fraktion wie

letzteres nachgewiesen werden konnte (VOLKMAN *et al.*, 1991; RÖSSLER *et al.*, 1995). Das eben genannte p41 wird vor allem mit frühen Infektionen in Verbindung gebracht (BERG *et al.*, 1991), es bestehen jedoch ausgeprägte Kreuzreaktionen mit anderen verwandten Bakteriengenera wie Treponemen und Rückfallfieber-(RF)-Borrelien, wodurch die diagnostische Relevanz des p41 umstritten ist (CRAFT *et al.*, 1986; WILSKE *et al.*, 1990; BRUCKBAUER *et al.*, 1992; SHIN *et al.*, 1993; ZOLLER *et al.*, 1993).

2 Lyme-Borreliose

2.1 Infektionsmechanismus

Eine transovarielle Übertragung von Borrelien bei Zecken ist zwar theoretisch möglich, jedoch äußerst selten (BONNET *et al.*, 2007; GERN, 2009), die Hauptübertragung findet durch und mit der Blutmahlzeit statt. Während der Blutmahlzeit gelangen Borrelien aus einem bereits infizierten Reservoirwirt in die Zecke (BURGDORFER *et al.*, 1982; MAGNARELLI *et al.*, 1987). Aufgrund fehlender Verdauungsenzyme im Mitteldarm der Zecke kann die Spirochäte überleben, wobei sie mittels des OspA an den in der Mitteldarmwand der Zecke befindlichen Rezeptor TROSPA (*tick receptor for OspA*) gebunden ist (Abb. 4) (SCHWAN *et al.*, 1995; SCHWAN & PIESMAN, 2000; GRAY, 2002).

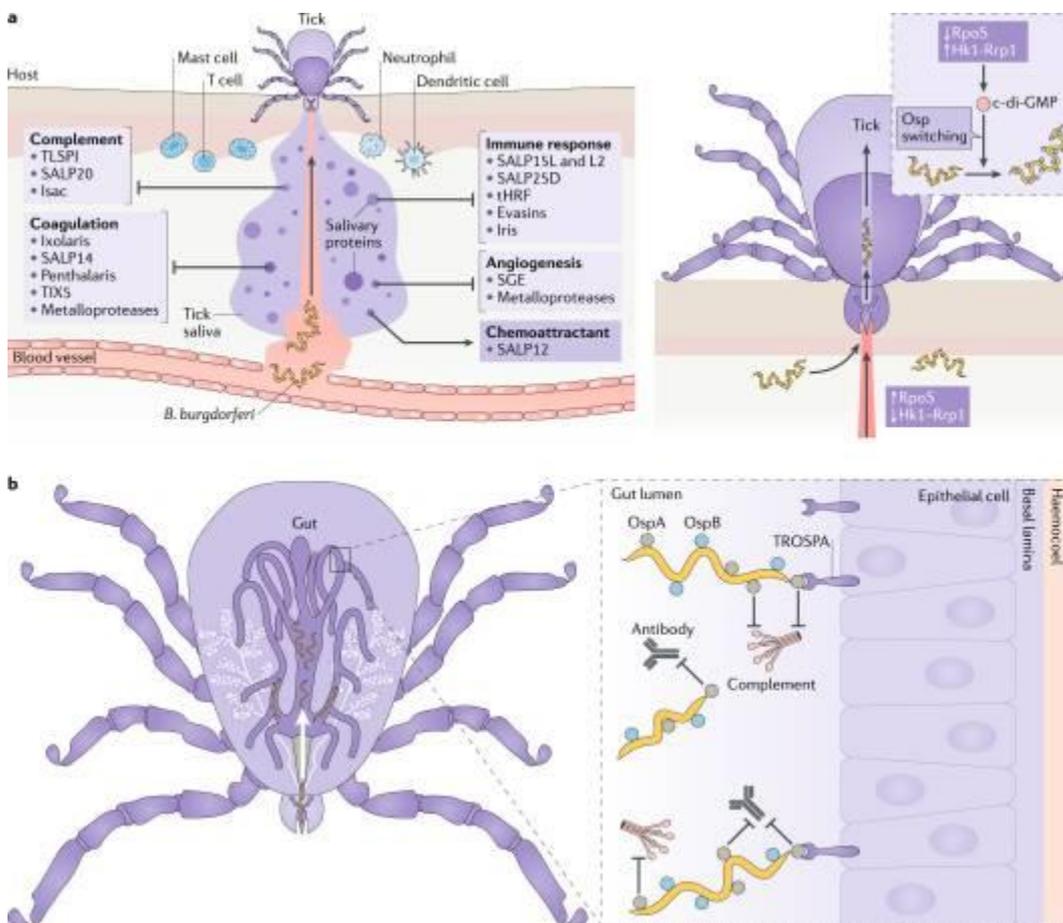


Abbildung 4: Aufnahme von *B. burgdorferi* aus einem infizierten Wirt in eine Zecke (KUROKAWA *et al.*, 2020)

Beginnt die Zecke auf dem nächsten Wirt den Saugakt, verändern sich durch Aufnahme von Gewebeflüssigkeit und Blut der pH-Wert und die Temperatur im Darm der Zecke. Diese chemischen Veränderungen können von den Borrelien erkannt werden, die Bakterien reagieren mit ansteigender Expression von OspC;

die Expression von OspA wird herunterreguliert, woraufhin sich die Bindung am Rezeptor TROSPA löst und die Borrelien durch den Darm über die Hämolymphe in die Speicheldrüsen wandern (Abb. 5). Von dort werden sie mit dem Speichel auf den Wirt übertragen (SCHWAN *et al.*, 1995; OHNISHI *et al.*, 2001; FINGERLE *et al.*, 2002; MUNDERLOH & KURTTI, 2005). Je nach Borrelienspezies ist die Übertragung der Erreger unterschiedlich effizient. *I. ricinus* überträgt *B. afzelii* beispielsweise früher und effektiver als *Bbs* (CRIPPA *et al.*, 2002). Auch der Zeitpunkt der Erregerübertragung variiert je nach Vektor: So überträgt *I. ricinus* bereits nach 16,7 Stunden Saugdauer in 50 % der Fälle *Bbsl* auf den Wirt, *I. scapularis* hingegen erst nach einer Mindestsaugdauer von 24 Stunden (PIESMAN *et al.*, 1987; DES VIGNES *et al.*, 2001; OHNISHI *et al.*, 2001; GERN, 2009).

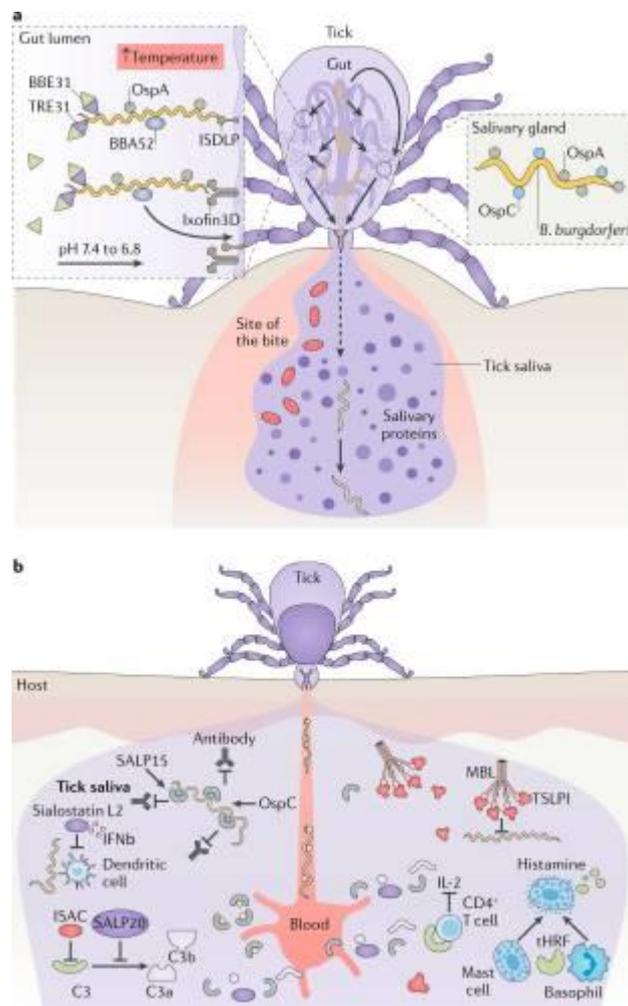


Abbildung 5: Übertragung von *B. burgdorferi* von der Zecke auf den Wirt (KUROKAWA *et al.*, 2020)

2.2 Immunantwort des Wirtes

Trotz ihrer zahlreichen Fähigkeiten, dem Immunsystem des Wirtes zu entkommen, lösen Borrelien vor allem in der Initialphase einer Infektion Abwehrmechanismen aus. Nach dem Stich der Zecke kommt es im umliegenden Gewebe durch einwandernde Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten zu einer unspezifischen Immunreaktion. Beim Menschen kann hierdurch das EM, das früheste Anzeichen einer LB, entstehen (STEERE *et al.*, 2004). Zwar gelingt es dem Immunsystem, mittels Phagozyten einen Teil der Erreger zu eliminieren, jedoch umgehen einige Borrelien diese Abwehrreaktion (MONTGOMERY *et al.*, 2002). Diese Spirochäten verursachen im umliegenden Gewebe multisystemische Entzündungsreaktionen und ziehen etwa zwei bis vier Wochen nach Infektion erste Ak-Bildungen nach sich. Zu diesem Zeitpunkt gelingt bereits der Nachweis von IgM-Antikörpern und vier bis sechs Wochen später auch der Nachweis von IgG-Antikörpern (CRAFT *et al.*, 1984). Der Nachweis von Ak gegen Borrelien gelang bei experimentell infizierten Hunden frühestens drei Wochen *p. i.* (LIANG *et al.*, 2000).

Im Falle einer chronischen Infektion werden häufig erneut IgM-Antikörper gebildet, sodass diese nicht unbedingt beweisend für eine kürzlich erfolgte Infektion sind. Ak gegen Borrelien persistieren teils lebenslang im Wirt, was zusammen mit den damit verbundenen proinflammatorischen Aktivitäten des Immunsystems wesentlich an der Pathogenese der LB beteiligt ist (MAGNARELLI *et al.*, 1990; APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1997a; TOPFER & STRAUBINGER, 2007; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; STANEK *et al.*, 2012). Zwar bewirken diese gebildeten Ak sowohl die Phagozytose (BENACH *et al.*, 1984) als auch die Lyse der Borrelien durch Aktivierung des Komplementsystems (KOCHI *et al.*, 1991), jedoch kann keine protektive Immunität verzeichnet werden, weder durch das angeborene noch das erworbene Immunsystem (STRAUBINGER *et al.*, 2000; STEERE, 2001; STANEK *et al.*, 2012).

Aufgrund dieser fehlenden Abwehr durch den Wirt kommt es im Verlauf der LB zu chronischer Arthritis, für welche massive Infiltrationen von Immunzellen, vor allem T-Lymphozyten, verantwortlich sind (HU & KLEMPNER, 1997). Auch Leukozyten wandern vermehrt in die betroffenen Gelenke: durch Interaktionen der Oberflächenproteine der Borrelien mit dem auf der Immunzelloberfläche

lokalisierten Toll-like-receptor-2 (TLR-2) wird die Zytokinkaskade, mit der Beteiligung von u.a. Interleukin (IL)-8, in Gang gesetzt (STRAUBINGER *et al.*, 1997b; HIRSCHFELD *et al.*, 1999).

2.3 Lyme-Borreliose in der Veterinärmedizin

Nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Hunden, Katzen und Pferden können Infektionen mit Erregern des *Bbsl*-Komplexes vorkommen (LISSMAN *et al.*, 1984; BURGESS, 1988; COHEN *et al.*, 1988; APPEL, 1990; MAGNARELLI *et al.*, 1990). Studien an Affen konnten klinische Anzeichen identisch mit denen der humanen LB provozieren (PACHNER *et al.*, 1995), und experimentelle Infektionen mit Borrelien an Mäusen, Ratten und Katzen riefen Arthritiden hervor (MOODY *et al.*, 1990; BURGESS, 1992; MOODY *et al.*, 1994; GIBSON *et al.*, 1995). Die ausführlichsten Untersuchungen zu LB bei Haussäugetieren wurden bisher bei Hunden vorgenommen.

2.3.1.1 Lyme-Borreliose der Hunde

Die Seroprävalenz von Hunden in Deutschland gegen Erreger des *Bbsl*-Komplexes variiert zwischen 2-20 % (LITTMAN, 2003; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Die Spezies *Bbss* und *B. garinii* konnten bei Feldinfektionen in Europa am häufigsten nachgewiesen werden (HOVIUS *et al.*, 1999; HOVIUS *et al.*, 2000; SKOTARCZAK & WODECKA, 2005; WODECKA *et al.*, 2009; SKOTARCZAK, 2014; PANTCHEV *et al.*, 2015). In den USA ist *Bbss* am meisten vertreten und wurde bei Hunden intensiv, sowohl in Feldstudien als auch Tierversuchen, beforscht. Andere Vertreter des *Bbsl*-Komplexes hingegen wurden bisher bei Tieren kaum untersucht, weshalb manche Autoren suggerieren, dass ausschließlich eine Infektion mit *Bbsl* zur caninen LB führt (LITTMAN *et al.*, 2006; RHODES *et al.*, 2013; LITTMAN *et al.*, 2018). Ein Auftreten klinischer Manifestationen wird bei etwa 50 % der infizierten Tiere vermutet (WILCZEK *et al.*, 2022). Experimentell infizierte Hunde entwickeln in bis zu 75 % der Fälle klinische Krankheitsbilder: in Studien mit jungen Beagles konnten nach einer mittleren Inkubationszeit von 68 Tagen klinische Manifestationen wie Fieber, Anorexie, Apathie, lokale Lymphadenopathie und rezidivierende Lahmheit aufgrund einer akuten Arthritis beobachtet werden (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; CALLISTER *et al.*, 2000).

Allerdings konnte bei den Hunden kein EM, das Hauptaugenmerk der klinischen

Anzeichen einer frühen, lokalisierten humanen LB, beobachtet werden. Hautveränderungen, die beim Hund rund um die Einstichstelle der Zecke auftreten, sind lediglich lokale Entzündungsreaktionen mit großflächigen Rötungen und Schwellungen ohne charakteristische, labordiagnostische Veränderungen (STRAUBINGER *et al.*, 1997a; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; LITTMAN, 2003).

Das Erkennen einer caninen LB unter Feldbedingungen gestaltet sich aufgrund der recht unspezifischen klinischen Anzeichen schwierig. Die übertragende Zecke wird oft übersehen; die unspezifischen klinischen Manifestationen der ersten Tage und Wochen wie Fieber, reduziertes Allgemeinbefinden und lokale Lymphknotenschwellung sind selbstlimitierend und werden vom Besitzer oft nicht wahrgenommen (LITTMAN, 2003; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010). Intermittierendes oder chronisches Lahmen, das teils mehrere Gelenke betrifft, tritt meist erst Wochen bis Monate nach der Infektion auf. Begleitend zeichnen sich hier bei manchen infizierten Tieren erneutes reduziertes Allgemeinbefinden und erhöhte Körpertemperatur ab (LITTMAN, 2003; LITTMAN *et al.*, 2006). Allerdings gibt es viele Differentialdiagnosen zu klinischen Manifestationen des Bewegungsapparates, wie beispielsweise Verstauchungen, Prellungen, altersbedingte Arthritiden oder Kreuzbandrisse (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

Bei natürlich infizierten Hunden der Rassen Golden Retriever, Labrador und Berner Sennenhund wurden schwerwiegende und teils tödlich verlaufende Nierenerkrankungen (d.h., Glomerulonephritiden, akutes Nierenversagen) mit einer LB in Verbindung gebracht. Ein Nachweis von Borrelien aus Nierengewebe gelang nicht, es wurden lediglich spezifische Ak gegen die Spirochäten im Blut nachgewiesen. Die „Lyme-Nephropathie“ ist vermutlich immun-mediiert und abhängig von der Borrelienspezies und der genetischen Disposition des Wirtes. Vor allem oben genannte Rassen scheinen prädisponiert für eine solche Form der LB zu sein, die Gründe hierfür sind noch nicht geklärt (DAMBACH *et al.*, 1997; LITTMAN, 2003; LITTMAN *et al.*, 2006; GERBER *et al.*, 2007; GERBER *et al.*, 2009; PREYß-JÄGELER *et al.*, 2020).

Zudem konnten bei einzelnen Hunden mit neurologischen Erscheinungen Ak gegen Borrelien nachgewiesen werden (FEDER *et al.*, 1991; MANDEL *et al.*, 1993). In einer Studie mit 54 Hunden mit Verdacht auf eine Neuroborreliose konnten allerdings weder im Blut noch im Liquor Ak gegen oder DNA von Borrelien

nachgewiesen werden. Demnach sei eine neurologische LB bei Hunden unwahrscheinlich (JÄDERLUND *et al.*, 2007).

Es gibt wenige canine Fälle, die eine Myokarditis aufgrund einer Infektion mit Borrelien des *Bbsl*-Komplexes beschreiben. In einem Bericht über zehn tote Boxer-Welpen konnten bei einem der Hunde Ak gegen Borrelien nachgewiesen werden (DETMER *et al.*, 2016). Im Jahr 2020 wurde ein Fallbericht veröffentlicht, in dem ein Hund aufgrund einer akuten Myokarditis euthanasiert werden musste. Bei diesem Tier konnten sowohl Ak diagnostiziert als auch Borrelien-DNA aus Herzgewebe isoliert werden. Dies entspricht der klinischen Ausprägung, die für die humane Lyme-Karditis beschrieben wurde (ADASZEK *et al.*, 2020).

2.3.1.2 Lyme-Borreliose der Pferde

Die equine LB ist weit nicht so erforscht wie ihr caniner Vertreter. Zwar gibt es auch beim Pferd Belege über die Bildung von Ak gegen Borrelien unter experimentellen Bedingungen, jedoch entwickelten diese Equiden keine einheitlichen klinischen Manifestationen (CHANG *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2000a). Chang und Mitarbeitern gelang es in mehreren Versuchen, die Immunantwort von Pferden gegenüber *B. burgdorferi* mittels KELA und Westernblot (WB) zu belegen (CHANG *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2000a; CHANG *et al.*, 2005). In diesen Tierversuchen wurden die Ponys infizierten Vektoren ausgesetzt; die serologisch ermittelten KELA-Werte variierten zwischen 200 und 590 und es konnten für eine Infektion spezifische Banden ermittelt werden (CHANG *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2000a; CHANG *et al.*, 2005).

Zwar konnten bislang trotz oben genannter Versuche keine konformen klinischen Anzeichen bei der equinen LB festgestellt werden (DIVERS *et al.*, 2018), jedoch gibt es in der Praxis Fälle und auch Fallbeschreibungen in der Literatur, in denen Borrelien des *Bbsl*-Komplexes als kausal für die Erkrankung der Tiere vermutet werden. Die erste beschriebene equine LB wurde 1986 bei einer Shetlandponystute aus Wisconsin, USA diagnostiziert. Die Stute litt an einer sich in Lahmheit äußernden degenerativen Karpalgelenkentzündung sowie einer Konjunktivitis mit Keratitis und Korneaödem. Da das Pony im mit Serum und Synovia durchgeführten Immunfluoreszenztest (IFAT) einen Titer von 1:1.024 für *B. burgdorferi* aufwies und zudem postmortal ein mikroskopischer Nachweis eben dieser Spirochäten aus der linken vorderen Augenkammer gelang, gingen die Autoren von einer LB aus

(BURGESS *et al.*, 1986). Seither wurden immer wieder klinische Veränderungen bei Pferden beschrieben, die vermutlich auf eine LB zurückzuführen waren. In den meisten dieser Fälle sind klinische Anzeichen unspezifisch. Beschrieben wurden Störungen des Allgemeinbefindens (MAGNARELLI *et al.*, 1988; HAHN *et al.*, 1996), Gelenkbeschwerden (BROWNING *et al.*, 1993; HAHN *et al.*, 1996; EGENVALL *et al.*, 2001; PASSAMONTI *et al.*, 2015), Gliedmaßen- und Hautveränderungen (SEARS *et al.*, 2012), neurologische Störungen (JAMES *et al.*, 2010; IMAI *et al.*, 2011; JOHNSTONE *et al.*, 2016; PECORARO *et al.*, 2019), okuläre Manifestationen (GERHARDS & WOLLANKE, 1996; PRIEST *et al.*, 2012) sowie Aborte und Reproduktionsstörungen (BURGESS, 1988; BURGESS *et al.*, 1988; COHEN *et al.*, 1992). Die klinischen Erscheinungsbilder der Studien kongruieren teils; am häufigsten wurden Lahmheit, Arthritiden, Hyperästhesie, Ataxie, Gelenkschwellungen, Fieber, Lethargie und Uveitis beschrieben. Einigen Autoren gelang zudem ein direkter Erregernachweis von *Bbsl* mittels Kultivierung (BURGESS & MATTISON, 1987; MANION *et al.*, 1998; LIEBISCH *et al.*, 1999) beziehungsweise PCR (HAHN *et al.*, 1996; SCHÖNERT *et al.*, 2008a; JAMES *et al.*, 2010; IMAI *et al.*, 2011; PRIEST *et al.*, 2012; SEARS *et al.*, 2012; JOHNSTONE *et al.*, 2016; PECORARO *et al.*, 2019). Zu hinterfragen sind hier allerdings zum einen die Kultivierung von *B. burgdorferi* aus der Niere zweier Fohlen sowie aus dem Gehirn eines dieser Tiere in Barbour-Stoenner-Kelly (BSK-II)-Medium und serologischem Ak-Nachweis mittels IFAT von Burgess und Mattison (BURGESS & MATTISON, 1987). Die geringe Spezifität des IFAT (siehe Kapitel 3.2.2) sowie die anspruchsvolle Kultivierung von Borrelien (siehe Kapitel 3.1.1) wegen geringer Erregerdichte in betroffenem Gewebe (KARLSSON *et al.*, 1990) lassen an den Ergebnissen zweifeln. Des Weiteren hat auch die Anzucht von Borrelien aus Hautbioptaten zweier kachektischer Pferde mit Polyarthritiden, Somnolenz und Endokarditis sowie eines Tieres mit sarkoiden hyperkeratotischen Hautveränderungen in Verbindung mit positiv ausfallendem IFAT eine geringe Aussagekraft (LIEBISCH *et al.*, 1999). Auch der Erregernachweis mittels PCR ohne ergänzende Nachweisverfahren muss in Frage gestellt werden, was in zwei der oben genannten Studien der Fall ist (IMAI *et al.*, 2011; PRIEST *et al.*, 2012). Zur Feststellung einer LB mittels PCR (siehe Kapitel 3.1.2) sollte auf diese immer ein zusätzliches, indirektes Diagnostikverfahren folgen (TALASKA, 1998; PRIEM & KRAUSE, 1999). Demnach kann der Verdacht einer equinen LB nur bei den Publikationen der

Autoren Browning und Sears bestätigt werden. Hier zeigten die betroffenen Tiere hohe Borrelien-spezifische Ak-Titer im ELISA sowie eine Verbesserung der klinischen Manifestation (Lahmheit in Kombination mit Fieber (BROWNING *et al.*, 1993) beziehungsweise multiple Papeln im Bereich des *Musculus masseter* (SEARS *et al.*, 2012)) nach Verabreichung einer Antibiose. Der direkte Erregernachweis mittels PCR gelang nur in einer der zwei Studien (SEARS *et al.*, 2012).

Die oben beschriebenen klinischen Manifestationen sind anderen Autoren zufolge jedoch Co-Infektionen mit weiteren Pathogenen wie *Anaplasma phagocytophilum* (Ap) geschuldet (CHANG *et al.*, 2000b; MAGNARELLI *et al.*, 2000; BUTLER *et al.*, 2005) und eine LB würde bei Pferden zu häufig falsch diagnostiziert werden (BARTOL, 2013). Die größte Schwierigkeit stellt hier die Standardisierung eines direkten und indirekten Erregernachweises zur Verifizierung einer Borrelieninfektion bei Pferden dar (SCHÖNERT *et al.*, 2008b).

Die Seroprävalenz von Ak gegen Erreger des *Bbsl*-Komplexes variiert bei Pferden stark und in Abhängigkeit von Endemiegebieten des Vektors *I. ricinus*. So werden europaweit Prävalenzen zwischen 11,9 % bis hin zu 48,0 % beschrieben (EGENVALL *et al.*, 2001; HANSEN *et al.*, 2010; MAURIZI *et al.*, 2010; KISS *et al.*, 2011; EBANI *et al.*, 2012; TSACHEV *et al.*, 2019; GEHLEN *et al.*, 2023), in den USA reicht diese in Minnesota sogar bis zu 58,7 % (DURRANI & GOYAL, 2011; WAGNER & ERB, 2012; FUNK *et al.*, 2016). Einige Autoren korrelieren eine hohe Seroprävalenz mit dem Auftreten klinischer Anzeichen (MAGNARELLI *et al.*, 1988; DURRANI & GOYAL, 2011; LAUS *et al.*, 2013; FUNK *et al.*, 2016); andere vermuten hier keinen Zusammenhang (GERHARDS & WOLLANKE, 1996; VERONESI *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2016; MEERSSCHAERT *et al.*, 2016). Die Speziesdifferenzierung und deren Prävalenzen beim Pferd sind weit weniger erforscht als bei Hunden. In den Fällen, in denen eine Differenzierung erfolgt ist, zeigten sich *B. afzelii* und *Bbss* als dominanteste Vertreter (BROWNING *et al.*, 1993; EGENVALL *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002; SCHÖNERT *et al.*, 2008a).

2.4 Therapie der Lyme-Borreliose

Im Falle einer caninen LB haben sich β -Laktam-Antibiotika und Tetracykline als effizienteste Therapiemöglichkeiten erwiesen (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; WORMSER & O'CONNELL, 2011). In jedem Fall sollte die Gabe der

Antibiose über einen Zeitraum von 28 Tagen erfolgen, wobei selbst dann Borrelien persistieren und Rezidive verursachen können (LEVIN *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1997a; STRAUBINGER *et al.*, 2000; WORMSER & SCHWARTZ, 2009; WAGNER *et al.*, 2015). In der Praxis wird hierbei aufgrund der einfachen Handhabung und der geringen Nebenwirkungen am häufigsten Doxycyclin im Abstand von 12 oder 24 Stunden verwendet (LITTMAN *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2013). Des Weiteren konnte die Effizienz von Amoxicillin-Gaben im Abstand von acht Stunden auch bei Hunden nachgewiesen werden (STRAUBINGER *et al.*, 1998a). Auch die Wirkung von Cefovecin konnte in einer Studie belegt werden, wobei der größte Vorteil im Sinne der Besitzerkompliance die nur zweimalige subkutane Applikation im Abstand von 14 Tagen anstatt der täglichen Tablettengabe ist (MEEUS *et al.*, 2012; WAGNER *et al.*, 2015). Allerdings handelt es sich hierbei um ein Cephalosporin der 3. Generation, für welches strikte Regeln und Einschränkungen bzw. Zulassungsbeschränkungen und damit Verbote der Gabe für einzelne Tierarten zu beachten sind (BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2018; EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2020).

Wie bei der Therapie einer humanen oder caninen LB stellen auch beim Pferd Tetracykline, Penicilline und Cephalosporine die effektivste Behandlungsoption dar. Der Zeitraum der Antibiotikagabe sollte auch hier mindestens 28 Tage andauern, wobei bis zu deren Beendigung eine deutliche Besserung der klinischen Anzeichen eintreten muss (POST, 1990; CHANG *et al.*, 2005). Chang und Mitarbeiter erprobten hierzu an 16 mit Borrelien infizierten Ponys die Wirksamkeit der obigen Antibiotika und konnten bei allen drei Therapieansätzen einen deutlichen Rückgang der Ak im WB verzeichnen. Bei der Gabe von Tetracyclin waren im Gegensatz zu Doxycyclin und Ceftiofur sowohl kulturell als auch mittels PCR keine Borrelien mehr in Gewebeproben nachweisbar (CHANG *et al.*, 2005). Unter Feldbedingungen gelang die Therapie jedoch aufgrund der hohen Rezidivrate von klinischen Manifestationen nur in einem Fall equiner LB (BROWNING *et al.*, 1993; HAHN *et al.*, 1996; LIEBISCH *et al.*, 1999; SCHÖNERT *et al.*, 2008a; JAMES *et al.*, 2010; IMAI *et al.*, 2011; SEARS *et al.*, 2012; PASSAMONTI *et al.*, 2015).

Um eine Infektion mit Borrelien und die Gabe von AB zur Therapie zu vermeiden, gibt es verschiedene präventive Maßnahmen wie Impfungen oder Antiparasitika.

Da die Prävention der LB nicht Fokus dieser Arbeit ist, wird an dieser Stelle lediglich auf andere Literatur verwiesen (WILCZEK, 2023).

3 Nachweis der Borrelien-Infektion

Da die Klinik einer LB sehr unterschiedlich ausfallen kann, ist eine laboratorische Bestätigung der Verdachtsdiagnose unerlässlich. Hierfür stehen sowohl direkte als auch indirekte Nachweismethoden zur Verfügung (AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005). Zudem ist die anamnestische Befunderhebung ein wichtiges Kriterium, um zusätzlich zum klinischen Erscheinungsbild eventuelle Zeckenexposition, Aufenthalte in Endemiegebieten, Vorbehandlungen mit Antibiotika, Impfungen und Zeckenprophylaxe mit einbeziehen zu können. Durch eine gründliche Anamnese können andere Krankheiten mit ähnlichen klinischen Manifestationen ausgeschlossen werden (DIVERS *et al.*, 2001; FRITZ & KJEMTRUP, 2003; BUTLER *et al.*, 2005; DIVERS, 2013; STRAUBINGER, 2015). Eine Labordiagnose sollte nie alleiniges Kriterium für die Diagnose einer Infektion mit Erregern des *Bbsl*-Komplexes sein, sondern immer mit eben genannten Faktoren zusammen betrachtet werden.

3.1 Direkte Nachweisverfahren

3.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von Borrelien ist ein diffiziles Anliegen. Die Vermehrung von *B. burgdorferi* erfolgt in mikroaerophilem Milieu anhand von Querteilung, wobei die Verdopplungszeit zwischen 8 und 20 Stunden beträgt und somit im Vergleich zu anderen Bakterien sehr langsam ist. Das optimale pH-Milieu liegt bei 7,6 und die Wachstumstemperatur sollte zwischen 30 °C und 35 °C betragen. Borrelien sind oft erst nach wochenlanger Inkubation nachweisbar (BARBOUR, 1984; BURGDORFER, 1984). Geeignete Untersuchungsmaterialien sind – abhängig von den klinischen Manifestationen – Haut- und Gewebebioptate sowie Punktate von Synovia oder Liquor. Der Erregernachweis aus Blut oder Urin gelingt nur selten (MANION *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 1999; LIEBISCH *et al.*, 1999; WILSKE *et al.*, 2007; HERZER *et al.*, 2014; KRAUSE & FINGERLE, 2014; FINGERLE *et al.*, 2017). Durch die lange Inkubationszeit wird die Überwucherung durch Begleitkeime begünstigt, was zum Absterben der Borrelien führen kann (SCHÖNBERG *et al.*, 1989). Um dies zu verhindern, können Antibiotika, gegen welche *B. burgdorferi* resistent ist, dem Kulturmedium hinzugegeben werden,

bspw. Rifampicin oder Phosphomycin (SCHÖNERT, 2006). Zudem kann *B. burgdorferi* weder Aminosäuren noch Fettsäuren, Cofaktoren und Nukleotide synthetisieren, was die Nährmedienauswahl erschwert (FRASER *et al.*, 1997). Als geeignete Medien haben sich das BSK-II-Medium und das Modified-Kelly-Pettenkofer-(MKP)-Medium erwiesen (BARBOUR, 1984; MUNDERLOH *et al.*, 1988; PREAC-MURSIC *et al.*, 1991; BERGER *et al.*, 1992; POLLACK *et al.*, 1993). Die Sensitivität der Anzucht liegt zwischen 10 % und 70 %, je nachdem, aus welchem Gewebe oder Körperflüssigkeit die Probe stammt. Die Kultivierung ist nur bei nicht vorbehandelten Patienten möglich, da selbst eine Kurzzeittherapie mit Antibiotika den kulturellen Nachweis verhindert (NADELMAN *et al.*, 1993). Zudem wird vermutet, dass Borrelien im persistierenden Stadium einen *viable-but-nonculturable* (VBNC) Status erreichen können (MALI *et al.*, 2017; CABELLO *et al.*, 2022). Nach erfolgreicher kultureller Anreicherung lassen sich die Borrelien mittels Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskopie bei einer 160- bis 1000-fachen Vergrößerung darstellen. Aufgrund der langen Inkubationszeit, des hohen Arbeitsaufwandes und einer geringen Sensitivität, vor allem bei extrakutanen Manifestationen, ist eine kulturelle Anzuchtung als diagnostisches Mittel in der Praxis trotz der Spezifität von fast 100 % nicht geeignet (WILSKE, 2003; AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010).

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Wie auch bei der Kultivierung kann eine PCR mit Geweben und Flüssigkeiten wie Haut, Blut, Urin, Synovia oder Cerebrospinalflüssigkeit erfolgen. Auch in fortgeschrittenem Stadium kann eine LB mittels Nachweis Borrelien-spezifischer DNA-Sequenzen diagnostiziert werden (ROSA & SCHWAN, 1989). Die PCR ist eine *in-vitro*-Amplifizierungsmethode bestimmter DNA-Abschnitte und kann an chromosomalen (z.B. der Proteine Flagellin, p66, 16S-rRibonukleinsäure (RNA)) oder Plasmid-lokalisierten (z.B. der Proteine OspA, OspB, OspC) Genen durchgeführt werden (MULLIS *et al.*, 1986; WILSKE *et al.*, 2007). Der Vorteil gegenüber der Kultivierung liegt bei der PCR in der Möglichkeit, nicht nur lebende, sondern auch tote (intakte und fragmentierte) Spirochäten nachzuweisen (CHANG *et al.*, 2000a). Allerdings ist ein positives PCR-Ergebnis kein Beweis für eine bestehende LB, sondern erlaubt lediglich den Rückschluss, dass Borrelien im Wirtsorganismus vorhanden sind oder waren. Auch nach Antibiotikagabe kann das Testergebnis noch positiv ausfallen (STRAUBINGER, 2015). Demnach sollte eine

PCR nur in Kombination mit anderen diagnostischen Verfahren und klinischen Befunden angewandt werden (TALASKA, 1998; PRIEM & KRAUSE, 1999). Aufgrund der fehlenden Standardisierung variieren PCR-Untersuchungen stark zwischen verschiedenen Laboren. Fällt das Ergebnis positiv aus, kann eine anschließende Sequenzierung Kreuzreaktionen dekuivrieren (STANEK & REITER, 2011; HERZER *et al.*, 2014; FINGERLE *et al.*, 2017). Des Weiteren können bei chronischen Infektionen falsch-negative Ergebnisse in der PCR auftreten, da hier das Erregervorkommen unterhalb der Detektionsgrenze liegen kann (KRUPKA *et al.*, 2009). Auch die Untersuchung von Blut und Urin mittels PCR ist nach derzeitigem Wissensstand nicht für die Diagnostik geeignet (STRAUBINGER *et al.*, 1998a; STRAUBINGER, 2000; LITTMAN *et al.*, 2006; LESCHNIK *et al.*, 2010). Um eine nicht-invasive Probenentnahme zu ermöglichen, wurde 2022 eine Methode entwickelt, bei der eine Art Impfpflaster um die Stichstelle platziert wurde. Aus der aufgesaugten Extrazellulärflüssigkeit konnten mittels PCR direkt *Borrelia burgdorferi* nachgewiesen werden (KIGHT *et al.*, 2022).

3.2 Indirekte Nachweisverfahren

3.2.1 Zweistufentest zum Nachweis spezifischer Antikörper

Seit 1995 wird in der Humanmedizin von den Centers of Disease Control die serologische Diagnostik im Zweistufentest (*standard two-tiered serologic testing*, STTT) empfohlen, wobei falsch-positive Testergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten wie Leptospiren oder Treponemen vermieden werden (BRUCKBAUER *et al.*, 1992; SHIN *et al.*, 1993; STEFFEN & HIRSCH, 2005; STEERE *et al.*, 2008; MIRAGLIA, 2016). Als erster Schritt wird mittels eines sensitiven ELISA vorselektiert, ob Ak gegen Borrelien vorhanden sind. Bei grenzwertigen oder positiven Ergebnissen wird ein Immunoblot in Form eines WB oder LIA durchgeführt, um infektionsspezifische Signale darzustellen. Nur Proben, die sowohl im ELISA als auch im Immunoblot positiv reagieren, werden als Borrelien-positiv eingestuft, wodurch die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse reduziert wird (STEFFEN & HIRSCH, 2005). Auch in der Veterinärmedizin hat sich der Zweistufentest als Methode der Wahl für die Diagnostik einer LB durchsetzen können (SHIN *et al.*, 1993; CHANG *et al.*, 2000a; MAGNARELLI *et al.*, 2000; STRAUBINGER, 2015). Mithilfe des WB oder LIA kann zudem bei Tieren zwischen Impfung und Infektion unterschieden werden

(KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; KRUPKA *et al.*, 2012; BARTH *et al.*, 2014).

3.2.1.1 ELISA

Der ELISA ist der erste Schritt des Zweistufenverfahrens. Hier werden im Schlüssel-Schloss-Prinzip sowohl IgG- als auch IgM-Ak nachgewiesen (CRAFT *et al.*, 1984; MAGNARELLI *et al.*, 1988). In der Borreliendiagnostik wird mit einem indirekten ELISA gearbeitet, bei welchem die Ag, bestehend aus Borrelienlysate oder rekombinanten Ag, auf der Mikrotiterplatte fixiert sind. Sind im Serum des Patienten Borrelien-Ak vorhanden, binden diese an die fixierten Ag auf der Platte. Ein zugegebener enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet an diese Ag-Ak-Komplexe; als letzter Schritt wird Substrat hinzugegeben und es findet eine Enzym-Substrat-Reaktion statt. Diese wird durch eine Farbentwicklung visualisiert, welche photometrisch messbar ist. Die Intensität der Farbentwicklung hängt von der Ak-Konzentration im Serum des Patienten ab, wodurch auf die Ausmaße der Infektion geschlossen werden kann (VOLLER *et al.*, 1978; KRAMER *et al.*, 1992). Vorteile des ELISAs sind die leichte Handhabung und das schnelle, unkomplizierte Detektieren negativer Seren. Deshalb dient er in erster Linie zur Vorselektion, um unspezifisch positive Ergebnisse zu verringern (MAGNARELLI *et al.*, 1997; STEFFEN & HIRSCH, 2005). Allerdings bietet der einfache ELISA nicht die Möglichkeit, zwischen geimpften und infizierten Tieren zu unterscheiden. Deshalb muss zur Differenzierung als zweiter Test im Zweistufenverfahren ein Immunoblot folgen (KRUPKA *et al.*, 2009; BARTH *et al.*, 2014).

3.2.1.2 KELA

Der KELA ist eine Modifizierung des ELISA, die in den 1980er Jahren bekannt wurde. Der Vorteil des KELA ist eine dynamische Messung der relativen Ak-Konzentration auf einer kontinuierlichen Skala, wodurch die Kinetik der Immunkomplexbildung erfasst wird. Die Kurve einer KELA-Messung ist direkt proportional zur Ak-Konzentration der Probe (TSANG *et al.*, 1980). In den 1990er Jahren wurde an der Cornell University (Ithaca, New York, USA) ein Protokoll für den Nachweis von IgG-Ak gegen Erreger des *Bbsl*-Komplexes bei Hunden entworfen (SHIN *et al.*, 1993) und getestet (CHANG *et al.*, 1995). Die Beschichtung der Mikrotiterplatte erfolgt hierbei mit Borrelien-Lysate von *B. burgdorferi* N40 als Ag. Nach der Durchführung des oben beschriebenen

indirekten ELISA und festgelegter Zeit für die Inkubation des Substrats wird dreimalig die Extinktion der Enzym-Substrat-Farbkombinationsreaktion in einminütigem Abstand bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen. Aus diesen Ergebnissen wird die Reaktionsgeschwindigkeit anhand der Steigung innerhalb einer linearen Funktion für jede einzelne Probe berechnet (SHIN *et al.*, 1993). Die gemessene optische Dichte (OD) wird anschließend in vergleichbare Einheiten (KELA units) umgerechnet. Sollten bei der Probenvorbereitung (z.B. Pipettieren) oder der Anwendung des Computersystems Fehler passieren, kann man dies erkennen, da keine lineare Reaktionskurve dargestellt wird (BACON *et al.*, 2003). Sowohl für Hunde (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1995), als auch für Pferde (CHANG *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2000a) wurde eine erfolgreiche Ak-Detektion mittels KELA durchgeführt.

3.2.1.3 Immunoblot

Um grenzwertige oder positive Seren weiter untersuchen zu können und so zwischen einer Impfung und Feldinfektion unterscheiden zu können, dient der Immunoblot als zweiter Schritt im Zweistufentest. Dieser lässt eine differenzierte Aussage über die Immunantwort gegen bestimmte Ag des Erregers zu. Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin wird der Immunoblot zur Differenzierung reaktiver Seren empfohlen (WILSKE *et al.*, 2007; MAY, 2009; KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; ROBERT KOCH INSTITUT, 2019).

3.2.1.4 Western-Blot

Der WB ist eine spezifische Form des Immunoblots (WILSKE & PREACMURSIC, 1993). Das Prinzip eines WB ist dem eines ELISA ähnlich. Zunächst werden die Proteine mittels Gelelektrophorese größenchronologisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort gebunden. Im Anschluss werden die zu untersuchenden Seren auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen und inkubiert. Ein mit Farbstoff konjugierter Sekundär-Ak bindet an die eventuell vorhandenen Ag-Ak-Komplexe, woraufhin der ganze Komplex mit Hilfe des Substrats und daraus resultierender Farbreaktion visualisiert wird. Entsprechend den im Serum vorhandenen Ak gegen spezifische Proteine entsteht ein typisches Muster auf den Proteinbanden der Nitrozellulosemembran (HAAS & BEER, 2015). Die Bezeichnung der Proteinbanden ergibt sich aus „p“ für „Protein“ und dem jeweiligen Molekulargewicht in kDa. In Europa werden als Lysat-Ag meist Stämme

der Spezies *B. afzelii* und *B. garinii* genutzt (STEERE *et al.*, 2008). Für eine Infektion spezifische Proteine sind p17, p39, Proteine mit einer Molekularmasse zwischen 83 und 100 kDa und insbesondere VlsE. Das VlsE-Oberflächenprotein besitzt stark immunogene Epitope und gilt aufgrund der *in-vivo*-Expression von lebenden Borrelien als Marker für eine aktive Infektion (ZHANG *et al.*, 1997; LIANG *et al.*, 1999a; PHILIPP *et al.*, 2001). In der Humanmedizin werden bei einem IgG-WB, welcher auf *B. afzelii* basiert, die Banden p14, p17, p21, p23 (OspC), p30, p39, p43, p58 und p83/100 als für eine Infektion spezifisch gesehen (HAUSER *et al.*, 1997; HAUSER *et al.*, 1998). Bei einem *B. afzelii*-basierten IgM-WB ist eine Reaktion der Banden p17, p23 (OspC), und p39 aufgrund der frühen, gegen diese Oberflächenproteine gerichteten Immunantwort des Wirtes bereits als positiv anzusehen. Allerdings ist die Sensitivität eines IgM-WB im Vergleich zu der des IgG-WB schwächer und begrenzt seine Aussagekraft (HAUSER *et al.*, 1999).

Vor allem für Hunde gilt eine Reaktion gegen das VlsE-Oberflächenprotein ebenso wie beim Menschen als Zeichen einer aktiven Infektion (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; KRUPKA *et al.*, 2012; BAUM *et al.*, 2014). Equine Seren infizierter Tiere reagieren vermehrt mit den Banden p41, p60, p75 und p83/100, wobei es sich größtenteils um Ak gegen Flagellen- und Hitzeschockproteine handelt und Reaktionen gegen diese Proteine deshalb keine allzu große Bedeutung zugeschrieben werden kann (KRUPKA *et al.*, 2012). Die p31-Bande konnte sowohl für Hunde als auch Pferde, welche OspA-Impfstoff injiziert bekommen hatten, als Nachweis einer erfolgreichen Vakzinierung beschrieben werden (STRAUBINGER *et al.*, 1995; KNÖDLSIEDER *et al.*, 2019).

3.2.1.5 Line-Immunoassay

Der LIA ist eine Modifizierung des IgG-WB zur qualitativen Detektion *Bbsl*-spezifischer Ak im Serum. Beim LIA werden die Proteine des Erreger-Ag im Gegensatz zum WB durch ein spezielles Sprühverfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragen, welche danach in Einzelstreifen geschnitten wird. Durch eine verringerte Anzahl aufgesprühter Proteine ist die Interpretation des Tests leichter (KRUPKA *et al.*, 2012). Sollten in der Probe Ak vorhanden sein, binden diese an die Ag auf der Nitrozellulosemembran. Mithilfe eines enzymmarkierten Sekundär-Ak werden diese Ag-Ak-Komplexe sichtbar gemacht und der auf der Membran entstehende Farbumschlag wird visuell ausgewertet

(HULINSKA, 1997; ROBERTSON *et al.*, 2000). Bei einer humanen Borrelieninfektion bilden sich zwei bis vier Wochen *p. i.* Ak, die im LIA sichtbar werden und welche vor allem gegen das Flagellin-Protein p41, das *common antigen* p60 sowie Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, wie OspC, gerichtet sind (SIMPSON *et al.*, 1991). Im Vergleich zu anderen Testsystemen (IFAT, ELISA) besitzt ein mit rekombinanten Borrelien-Proteinen beschichteter LIA die höchste Sensitivität (93,2 %).

Für Hunde hat sich der LIA als effiziente und sensitive Methode der Borreliendiagnostik erwiesen. Hierbei hat sich wie beim Menschen besonders das Protein VlsE als Marker einer aktiven Borrelieninfektion herausgestellt (KRUPKA & STRAUBINGER, 2010; KRUPKA *et al.*, 2012; BARTH *et al.*, 2014). Beim Pferd gibt es bislang keine vollständigen Erkenntnisse über die Ausbildung spezifischer Ak bei einer LB, wobei in einer Studie bei positiv getesteten Pferden die Kombination der Proteinbanden VlsE, DbpA und p38 in 25 % der Fälle auftrat. Ak gegen die Oberflächenproteine OspC und OspA schienen hingegen nicht spezifisch für eine Infektion zu sein, insbesondere da OspA-Antikörper meist nach Impfungen zu finden sind (KRUPKA *et al.*, 2012).

3.2.2 Immunfluoreszenztest

Der IFAT ist ein zeitaufwendiges, nicht automatisierbares Testverfahren, welches auf einer Ag-Ak-Reaktion beruht. Diese wird mithilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt (COONS *et al.*, 1941). Inaktivierte Borrelien, die auf Objektträgern mit definierten Feldern fixiert werden, fungieren als Ag, wobei ihre Genospezies die Testqualität beeinflussen. Die Serumproben werden in einer Verdünnungsreihe auf die Felder gegeben; vorhandene Ak binden an die Oberflächenantigene der Borrelien, die auf dem Objektträger fixiert worden sind. Diese Ag-Ak-Komplexe werden mittels fluoreszierendem Sekundärantikörper mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht. Burgdorfer und Mitarbeiter entwickelten einen IFAT mit hoher Sensitivität, welcher sich frühzeitig in der Borreliendiagnostik etablierte. Kreuzreaktionen mit Leptospiren, anderen Spirochäten aus dem Magen-Darm-Trakt sowie gramnegativen Enterobakterien limitieren den IFAT jedoch als Diagnostikmethode (BURGDORFER *et al.*, 1982; MAGNARELLI *et al.*, 1987; KÄSBOHRER & SCHÖNBERG, 1990; TALASKA, 1998). Ein weiterer Nachteil sind die uneinheitlichen Protokolle der durchführenden Labore, welche eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht

zulassen (CRAFT *et al.*, 1984; STRAUBINGER, 2015). Auch ist eine Trennung zwischen geimpften Tieren und Feldinfektionen nicht möglich, was den Einsatz des IFAT in der Borrelien-Diagnostik weiter einschränkt (LITTMAN *et al.*, 2006). Dennoch wird er teils immer noch für die Validierung von Seroprävalenzen beim Pferd eingesetzt (DURRANI & GOYAL, 2011).

3.2.3 C₆-Peptid-Schnelltest

Als ergänzende Maßnahme zum Zweistufentest erweist sich der C₆-ELISA als schnelle, sinnvolle Methode (STRAUBINGER, 2015). Dieser Test nutzt das hochspezifische, synthetische C₆-Peptid, ein aus 25 Aminosäuren bestehendes Peptid der IR₆ des infektionsspezifischen VlsE, welches beim Hund eine ausgeprägte Immunogenität hervorruft (LIANG & PHILIPP, 1999; LIANG *et al.*, 2000). Weder bei humanem noch bei caninem Serum konnten Kreuzreaktionen mit impfspezifischen OspA-Antikörpern nachgewiesen werden, was einen großen Vorteil gegenüber dem ELISA darstellt. Somit können auch bei geimpften Tieren Infektionen diagnostiziert werden. Zudem reagierte der C₆-ELISA bei experimentell infizierten Hunden bereits drei Wochen *p. i.*, was einen sehr frühen Nachweis Borrelien-spezifischer Ak erlaubt (LIANG *et al.*, 2000; LEVY, 2002; O'CONNOR *et al.*, 2004). Des Weiteren kann bei antibiotisch therapierten Hunden und Menschen ein Absinken des C₆-Antikörperspiegels verzeichnet werden (PHILIPP *et al.*, 2001). In der Veterinärmedizin ist der C₆-ELISA als kommerzieller Schnelltest für canine Seren erhältlich (SNAP[®] 4Dx Plus Borreliose; IDEXX Laboratories, Inc.); es konnten auch equine Proben damit erfolgreich untersucht werden (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2008).

3.2.4 Lyme Multiplex Assay

Eine weitere Möglichkeit der indirekten Diagnostik bietet der an der Cornell University (Ithaca, New York, USA) entwickelte Lyme Multiplex Assay (LMA). Dieser wird zur Untersuchung von Seren auf das Vorhandensein von Ag gegen drei Borrelien-spezifische Oberflächenproteine (OspA, OspC, OspF) verwendet, wobei die rekombinanten Ag an fluoreszierende Kügelchen (Multiplex beads) gekoppelt werden. Sind im Serum Ak gegen diese Proteine vorhanden, werden Ag-Ak-Komplexe gebildet und mittels Biotin-konjugiertem Sekundärantikörper, Biotin-bindendem Streptavidin-Protein und dem Farbstoff Phycoerythrin sichtbar gemacht. Im Anschluss misst ein *multiplex reader* die Intensität der entstandenen

immunfluoreszierenden Bindung und berechnet diese in *Median fluorescent intensities* (MFI) als maßgebende Einheit. Mit diesem Verfahren können Ak-Konzentrationen im pg/ml-Bereich detektiert werden (WAGNER *et al.*, 2011b; WAGNER *et al.*, 2011a). Resultate mit MFI-Werten von über 2.000 für OspA, über 1.000 für OspC und über 1.250 für OspF gelten als positiv (FUNK *et al.*, 2016). Vorteile des LMA sind laut Hersteller die frühzeitige Ak-Detektion ab 3-5 Wochen *p. i.* (WAGNER *et al.*, 2013) sowie die Differenzierung zwischen frühen und chronischen Infektionen und Impfungen. Der Nachweis von Ak gegen OspC sei demnach beweisend für eine frühe LB, da diese Ak bereits drei Wochen nach einer Infektion auftreten können und nach 7-11 Wochen wieder deutlich zurückgehen. Die Detektion von Ak gegen OspF hingegen ist 5-8 Wochen *p. i.* erfolgreich und stagniert auf hohem Niveau, was als Hinweis für eine chronische LB gilt (WAGNER & ERB, 2012). Werden Ak gegen OspA nachgewiesen, spricht dies für eine Vakzination des Tieres gegen Borrelien (CHANG *et al.*, 1999). Laut Krupka *et al.* deutet das Vorhandensein von Ak gegen OspC jedoch nicht auf eine Infektion hin, da in einer Studie mit einem LIA sowohl negative, als auch grenzwertige und positiv getestete Pferde Reaktionen gegen die OspC-Proteinbande aufwiesen (KRUPKA *et al.*, 2012).

3.2.5 Lymphozyten-Transformationstest

Um die Zeitspanne bis zur Bildung von Borrelien-spezifischen Ak in der Diagnostik zu umgehen, wurde der Lymphozyten-Transformationstest (LTT) entwickelt. Dieser stellt die Proliferationskapazität zytotoxischer T-Lymphozyten dar und untersucht somit die frühzeitige, zelluläre Immunantwort. Die Blutprobe wird mit Salzlösung und Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer versetzt, um mittels Zentrifugation die Lymphozyten vom Blut abtrennen zu können. Die Lymphozyten werden mit aus lysierten Erregern entstammenden oder rekombinanten Borrelien-Ag und Ag-präsentierenden Zellen inkubiert; 16 Stunden vor der Zellernte wird Thymidin (³H-Thymidin) hinzugefügt (BARNETSON & GAWKRODGER, 1995; SIEGMUND-SCHULTZE, 2007). Bei der Bildung von Ag-stimulierenden Lymphozyten wird gleichzeitig die DNA-Synthese gesteigert, wodurch das Nukleotid ³H-Thymidin intrazellulär aufgenommen und in die DNA der Lymphozyten eingebaut wird. Nach einer 4- bis 5-tägigen Markierungszeit und hypotoner Zellyse wird der entstandene Überstand durch einen Glasfaserfilter filtriert (EVISON *et al.*, 2005). Wenn im Blut Borrelien-spezifische-T-

Lymphozyten vorhanden sind, bleiben deren markierte DNA-Moleküle am Filter haften. Mit einem Szintillationszähler kann die β -Strahlung des in der DNA gebundenen ^3H -Thymidins gemessen und als Maß für die Zellteilung bestimmt werden (SCHÜTT & BRÖKER, 2011). Eine Möglichkeit zur frühzeitigen Detektion aktiver Infektionen sowie der Verlaufskontrolle disseminierter Infektionen und der Abklärung grenzwertiger Fälle bietet ein LTT mit spezifischen Borrelienlysate-Ag (OspA, OspC, p39, BmpA, Oberflächenprotein G) der Spezies *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* (BAUER *et al.*, 2001; VALENTINE-THON *et al.*, 2007; VON BAEHR *et al.*, 2012). Sowohl das Nationale Referenzzentrum für Borrelien als auch die Schweizerische Gesellschaft für Infektiologie bemängeln jedoch die Sensitivität und Spezifität des LTT sowie die mangelnde Standardisierung dieses Verfahrens. Dieses Testverfahren wird deshalb als ungeeignet für die Diagnostik der LB erachtet (EVISON *et al.*, 2005; WILSKE & FINGERLE, 2005; DESSAU *et al.*, 2014).

3.2.6 ELISPOT

Der Enzyme-Linked Immunospot Assay (ELISPOT) ist eine Art Modifizierung des LTT nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Er dient der Quantifizierung Ag-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten, indem er ihre Zytokinproduktion misst (CZERKINSKY *et al.*, 1988). Wie beim LTT werden auch beim ELISPOT die T-Lymphozyten durch Inkubation mit rekombinanten Borrelien-Ag und Ag-präsentierenden Zellen stimuliert. Durch die Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten wird vermehrt Interferon (IFN)- γ sezerniert, welches durch an der Mikrotiterplatte gekoppelte IFN- γ -Fang-Ak gebunden wird. Nach hypoosmotischer Zellyse und Entfernung der Zellreste kann mit enzymgekoppeltem IFN- γ -Detektions-Ak inkubiert werden, welcher ein anderes Epitop bindet als der IFN- γ -Fang-Ak. Somit entstehen Immunkomplexe, welche mittels chromogenem Substrat sichtbar gemacht werden. Es werden farbige Punkte (*spots*) um die IFN- γ -produzierenden Zellen sichtbar gemacht, welche computergestützt gezählt werden, sodass im Verhältnis zu den eingesetzten Lymphozytenmengen dargestellt werden kann, ob sie durch den Kontakt mit Borrelien spezifisch erhöht sind (SCHÜTT & BRÖKER, 2011; MURPHY *et al.*, 2012).

Laut einer Studie aus dem Jahr 2013 hat ein neu entwickelter ELISPOT (iSPOT Lyme™) eine signifikant höhere Spezifität und Sensitivität als ein WB (JIN *et al.*, 2013). Jedoch finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich Spezifität (82-94 %)

und Sensitivität (36-84 %), die die obige Aussage widerlegen (NORDBERG *et al.*, 2012). Auch für die Borreliendiagnostik von Hunden und Pferden ist ein ELISPOT kommerziell erhältlich (SpiroFind Vet™, Boulder Diagnostics Europe GmbH, Mellrichstadt, Germany). Jedoch werden aufgrund mangelnder Validierung weder LTT noch ELISPOT für die Borreliendiagnostik empfohlen (WILSKE & FINGERLE, 2005; MARQUES, 2015).

Eine zuverlässige Diagnose von Borrelien-spezifischen Ak und eine Unterscheidung von geimpften und infizierten Tieren sind von großer Bedeutung. Nur so kann eine unnötige Gabe von AB bei gesunden Tieren vermieden werden, was den Patienten die Nebenwirkungen dieser erspart und zudem im Sinne des One-Health-Gedanken ist. Deshalb wurden in der nachfolgenden Publikation die Seren von 200 Hunden und 200 Pferden mit bekanntem Borrelien-Ak-Status in zwei kommerziell erhältlichen LIAs getestet. Die Testergebnisse wurden hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, der Diagnose und Handling verglichen, um die labordiagnostisch besten Resultate erzielen zu können.

III. PUBLIKATION



Article

Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-Specific Antibodies in Sera of Canine and Equine Origin—A Comparative Study with Two Line Immunoassays

Sophie Charlotte Doff, Jasmin Wenderlein , Anna Wiesinger, Stephanie Hiereth, Sebastian Ulrich  and Reinhard K. Straubinger * 

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

* Correspondence: r.straubinger@lmu.de

Simple Summary: The causative agents of Lyme borreliosis, spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, can be transmitted via various life stages of the tick, making this disease a serious concern pertaining to One Health approaches. The detection of specific antibodies against *Bbsl* is generally achieved by using a two-tiered test approach based on an ELISA combined with a line immunoassay (LIA). In this study, canine and equine serum samples with known antibody status were tested with two different LIAs. Results were compared in terms of sensitivity, specificity, diagnostic outcome for dogs and horses, as well as of operability of the test. For canine serum samples, reliable results can be achieved with both LIAs. In contrast, the serodiagnosis of horses is still challenging, and improvements of both LIAs are recommended.

Abstract: Lyme borreliosis is a vector-borne disease in humans and animals caused by bacteria from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*Bbsl*). The possible transmission of *Bbsl* from companion animals to humans via ticks makes this disease important in terms of One Health approaches. Thus, early and accurate diagnosis and treatment are of utmost importance. Today's standard for the detection of specific antibodies against *Bbsl* is a two-tiered test system based on an ELISA for screening combined with a line immunoassay (LIA) for confirmation. In this study, 200 canine and 200 equine serum samples with known antibody status were tested with two different LIAs (A and B). Results were compared regarding sensitivity, specificity, the diagnostic outcome for dogs and horses, as well as operability of the test. The results for canine serum samples corresponded to 94.0%, making both LIAs a good choice for LB diagnosis in dogs. For equine serum samples, the agreement of both tests was 65.5%, displaying the challenge equine samples still provide in LB diagnostic. Major concerns were the interpretation of the OspA antigen (AG) signal and the use of unspecific (i.e., p100/p83) or too sensitive signals on the LIA. The operability of both LIAs was equally user-friendly. Regarding the tests' evaluation, the scanning process provided by LIA A was a major advantage considering the comparability of the tests.

Keywords: antibody; *Borrelia burgdorferi* sensu lato; canine; equine; serum diagnosis; line immunoassay



Citation: Doff, S.C.; Wenderlein, J.; Wiesinger, A.; Hiereth, S.; Ulrich, S.; Straubinger, R.K. 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*, 633. <https://doi.org/10.3390/vetsci9110633>

Academic Editor: Fernando Ferreira

Received: 29 September 2022

Accepted: 12 November 2022

Published: 14 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



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

Lyme borreliosis (LB) is the most diagnosed human vector-borne disease in Europe and Northern America. The infection occurs in dogs and horses and is caused by spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex (*Bbsl*). Seroprevalence for *Bbsl*-specific antibodies in dogs varies between 0.1% and 15.0% worldwide [1–3], while in horses, it ranges from 8.0% to 33.0% [4,5].

There are several diagnostic methods for detecting borrelial infections in mammalian hosts. Culture of *Borrelia* spp. is complicated and may take up to six weeks [6–8]. The

detection of *Bbsl*-specific DNA via polymerase chain reaction (PCR) is discussed controversially, as low numbers of borreliae in tissues of infected hosts might lead to false-negative results [9–11]. Since the direct detection of borrelial organisms is difficult and prone to erratic results [12], indirect tests detecting *Bbsl*-specific antibodies are the method of choice in LB diagnostics [13]. The first serologic test used was the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT), which contained a broad spectrum of antigens [12,14,15]. Due to low specificity [16] and the inability to discriminate between infected and vaccinated individuals [17], further test systems such as ELISAs [16,18] and Western blots [19] have been developed [20]. Western blots (WB) were established to detect well-characterized antibodies, which are highly specific for the serologic status [19]. Proteins are blotted on nitrocellulose membranes and bind *Bbsl*-specific antibodies of the patient's serum. Those immune complexes are subsequently visualized by color reactions on the carrier [19]. This diagnostic process allows the specific detection of borrelial infections and the differentiation between vaccinated and infected patients [21,22]. Suitable antigens for immunoblotting are the following proteins (p): p18/p21 (decorine binding protein A, DbpA), p23/24 (outer surface protein C, OspC), p28, p30 (OspA), p39 (borrelia membrane protein A, BmpA), p41, p43, p45, p58, p66, p83, p93, and p100 [13,23,24]. Commonly, these proteins are derived from *B. afzelii* and show a broad cross-reactivity with antibodies induced also by other species of the *Bbsl*-complex [25,26]. The detection of the lipoprotein variable major protein-like sequence expressed (VlsE) in serologic diagnostic procedures contributes to an even higher specificity of these tests [27]. The VlsE gene contains a lipoprotein leader sequence, a N- and C-terminal unique conserved region, and a *vls* cassette with variable (V1–V6) and invariable regions (IR1–IR6) [28,29]. The expression of the VlsE lipoprotein occurs only in vivo by metabolically active *Bbsl* organisms and is a highly specific marker for infection [27].

The current diagnostic standard for LB is based on a two-tiered test system in which an ELISA with a high sensitivity serves as the first screening step [30,31]. A kinetic ELISA (KELA) is a diagnostic method in ELISA format, and its usability and the possibility of automatization contribute to its popularity [30,32]. Subsequent verification of KELA-positive samples and the differentiation between vaccination and infection status is achieved by immunoblotting the samples using assays such as the line immunoassay (LIA). LIAs were developed to standardize reactions and simplify the diagnostic process. Hence, recombinant antigens are sprayed on membranes as single antigen (AG) lines. The specificity of these semi-quantitative line immunoblots is very high, allowing differentiation between vaccinated and naturally infected animals [33].

In this study, we compared two LIAs by testing them with canine and equine serum samples obtained from animals with known antibody status against *Bbsl*. A regular reconsideration of available test systems is detrimental, as science advances and new insights and opportunities should be met with the diagnostic methods available. As the treatment of LB is not trivial and the silent infection of canines and equines with *Bbsl*-complex species is a One Health concern, the appropriateness of diagnostic methods used to detect antigens against *Bbsl*-complex species should be verified regularly. Results were compared in terms of sensitivity, specificity, and diagnostic outcome to emphasize the benefits and detriments of each LIA. Further, the handling, operability, and evaluation procedures were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Serum Samples

A total of 400 serum samples were assessed for *Bbsl*-specific antibodies with an in-house KELA and two LIAs. The collection of sera consisted of 200 canine and 200 equine samples (Table 1). The sera were sent to the Chair for Bacteriology and Mycology of the LMU Munich for diagnostic purposes or were available from previous experiments and thereafter stored at -80°C . All tested sera were from animals showing clinical signs matching those of LB, and antibiotic treatment of animals needed precursory serologic confirmation. Those serum samples were tested with the in-house KELA and the Borrelia

Veterinär plus OspA LINE (VIROTECH Diagnostics GmbH, Ruesselsheim, Germany) or its predecessor model for past research or diagnostic purposes. For the conduction of this study, residuals from these canine and equine serum samples with matching antibody status determined in the previous diagnostic testing (i.e., seropositive, seronegative, equivocal, or vaccinated) were selected. However, the testing was based on antibody detection only, and the presence of *Borrelia* spp. organisms was not determined. To avoid biases due to possible false allocation in the previous serologic testing, two control groups were included in this study. The “canine control sera” consisted of serum samples from dogs with a confirmed *Bbs* infection status (i.e., “positive”), vaccinated (i.e., “vaccination”), or specific-pathogen free (i.e., “negative”) [34–36]. The “equine control sera” originated from a vaccination study with horses using the vaccine EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) [37].

Table 1. Serostatus of canines and equines used in this study.

	Seropositive	Equivocal	Seronegative	Vaccinated
Canine test sera (n = 150)	50		50	50
Canine control sera— positive/vaccination/negative (n = 50) *	12		19	19
Equine test sera (n = 150)	50	50	50	
Equine control sera—vaccination (n = 50) **				50

* Dogs used for studies with *Bbs* infections at Cornell University (Ithaca, NY, USA) [34–36]. ** Horses experimentally vaccinated with the vaccine EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) [37].

All serum samples described in this study were again tested for quantitative antibody levels with the in-house KELA and afterward analyzed using the two LIAs further named LIA A and LIA B. For the serologic testing, the sera were thawed and stored at +8 °C for a maximum of six hours between the tests.

2.2. Antibody Detection in the Serum Samples

The KELA used in this study to measure “total *Bbs*-specific” and “OspA-specific” antibody levels was conducted as published previously [31,32].

2.2.1. LIA A

LIA A is a line immunoassay for semi-quantitative detection of specific antibodies against *Bbs*-complex species. The detection of antibodies was performed according to the manufacturer’s instructions with the supplied nitrocellulose strips. All antigens present on the strips are listed in Table 2 along with the genospecies from which they were derived.

All chemical components needed for the antibody detection with LIA A were brought to room temperature before use. First, the wash and incubation buffer (WIB) were prepared by mixing the buffer concentrate with aqua destillata (dH₂O) in a ratio of 1:5. Then, 1.5 mL of the WIB was added to each well of a ten-welled incubation tray. One test strip for each tested serum was then placed in one of these incubation wells. The incubation tray was placed on the rocking shaker for five minutes until all strips were fully moistened. Afterward, 15 µL of the serum sample was added to each well and incubated for 45 min on the rocking shaker. After carefully draining all fluids, 1.5 mL of WIB was added per well. After five minutes of incubation on the rocking shaker, all fluids were poured off; this washing step was repeated three times in total. Then, 1.5 mL of the conjugate was added to each well and incubated on the rocking shaker for 45 min followed by three washing steps as described above. After draining all liquids, 1.5 mL of the substrate was added to each

well. After an incubation for ten minutes followed on the rocking shaker, all fluids were removed, and the strips were washed three times with 1.5 mL of dH₂O. The strips were then carefully removed from the wells and placed on a clean, absorptive paper to dry for at least 20 min.

Table 2. Recombinant antigens sprayed on the nitrocellulose strips of both LIAs.

Antigen	LIA A	LIA B
VlsE	<i>Ba</i>	<i>Bbss, Bg</i>
OspA	<i>Ba</i>	<i>Ba, Bg, Bbss</i>
DbpA/p18	<i>Bbss, Bg, Ba, Bs</i>	<i>Bg, Bbav, Ba</i>
OspC/p23	<i>Ba, Bbss, Bs, Bg, BgII</i>	<i>Ba, Bbav, Bbss</i>
BmpA/p39	<i>Ba</i>	<i>Ba</i>
p58	<i>Bg</i>	<i>Bbav</i>
p83	np	<i>Ba</i>
C ₆	<i>Bg</i>	np
p41	<i>Bbss</i>	np
p100	<i>Ba</i>	np

Antigens derived from the following genospecies: *B. afzelii* (*Ba*), *B. burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *B. bavariensis* (*Bbav*), *B. garinii* (*Bg*), *B. garinii II* (*BgII*); probably *B. bavariensis*, *B. spielmanii* (*Bs*), not present on the assay (np). VlsE, variable major protein-like sequence expressed; Osp, outer surface protein; DbpA, decorin binding protein A; BmpA, borrelia membrane protein A; p, protein.

The LIA strips were evaluated using the manufacturer's scanner and software version 5.1.2. with values from 0 to 0.9 (negative), 1.0 (equal to cut-off control (COC)), and greater than 1.0 (positive). Values have then been automatically assigned to a result by the scanner (Table 3).

2.2.2. LIA B

LIA B was developed for semi-quantitative detection of *Bbsl*-specific antibodies. All antigens present on the strips are listed in Table 2 along with the genospecies from which they were derived. Antibody detection with the supplied LIA strips was performed according to the manufacturer's instructions. All components were brought to room temperature before use. The washing buffer concentrate was mixed 1:10 with dH₂O. For each tested serum sample, one supplied strip was placed in an incubation well that is part of a supplied incubation tray consisting of eight wells. Compounded washing buffer (1.5 mL) was added to each reaction well; the incubation tray was then placed on the rocking shaker to thoroughly moisten the LIA strips for one minute. Next, 15 µL of serum was added to each well and incubated for 30 min on the rocking shaker. After incubation, fluids were carefully poured off. The strips were washed with 1.5 mL of washing buffer for five minutes and three times in a row while placed on the rocking shaker. For the next step, the IgG-conjugate was diluted at 1:100 with the washing buffer, and 1.5 mL of the compounded conjugate mix was dispensed into each well and incubated for 30 min on the rocking shaker. After pouring off all fluids, washing steps were repeated three times as described above and all fluids were drained carefully. Subsequently, 1.5 mL of dH₂O was added to each well, incubated for one minute, and then removed. Then, 1.5 mL of the substrate was added to each well and incubated for twelve minutes. After removing the substrate from the incubation wells, the substrate reaction was stopped by adding 1.5 mL of dH₂O to the incubation well for one minute, and thereafter, all fluids were poured off. This step was repeated three times. All fluids were then drained, and the strips were carefully removed from the incubation wells and transferred to a clean, absorptive paper for drying.

Table 3. Allocation of serum samples based on results obtained with LIA A and to its manufacturer's instructions.

Allocation Categories	Canine Sera	Equine Sera
neg	0–1 AG lines \geq COC except OspA or VlsE/C ₆ AG line	0–2 AG lines \geq COC except OspA or VlsE/C ₆ AG line
equiv	2–3 AG lines \geq COC except OspA or VlsE/C ₆ AG line	VlsE/C ₆ AG line and 0–2 AG lines \geq COC or 3 AG lines except VlsE AG line \geq COC
pos	VlsE/C ₆ AG line or ≥ 4 AG lines (except OspA AG line) \geq COC	VlsE/C ₆ AG line and ≥ 3 AG lines \geq COC or ≥ 4 AG lines \geq COC or VlsE/C ₆ AG line and p18 AG line and ≥ 1 AG line \geq COC
vac	OspA AG line and ≥ 0 AG lines (except VlsE/C ₆) \geq COC	-
vac + pos	OspA AG line and VlsE/ C ₆ AG line and ≥ 0 AG lines \geq COC	-

VlsE and C₆ are considered as one AG line; however, the appearance of one of the two lines is enough to allocate samples to the categories "equiv" and "pos" as well as "vac + pos". Horses with an OspA AG line were evaluated once according to the evaluation protocol for samples from horses with the antigen-antibody reaction on the OspA AG line and once again according to the evaluation protocol for vaccinated and vaccinated and positive dogs. AG line, antigen line; COC, cutoff control AG line.

Evaluation of the strips was carried out visually by the examiner; reactions were categorized according to the AG signal coloration showing a semiquantitative amount of immunocomplexes. The cut-off control in the form of a strip that was developed with the supplied cut-off concentrate was compared to the signals produced by the serum samples. Control AG lines on the cut-off strip will be abbreviated as COC. Color reactions were categorized as "–", less than the COC; "+", identical to the COC; "++", stronger than the COC; or "+++", considerably stronger than the COC. However, the results "+", "++", and "+++" were all considered positive and did not make a difference in the overall result for a single sample (Table 4). COC strips were prepared according to the manufacturer's instructions, which equaled the production of the LIA strips for serum samples. Instead of adding 15 μ L of serum, 100 μ L of cut-off concentrate was added to the incubation wells of the COC. For canine and equine sera, an individual cut-off strip with a cut-off concentrate specific for canine and equine samples was produced.

If the two LIAs disagreed in their results for a serum sample, both tests were performed again, and samples were evaluated anew to exclude the possibility that there was a technical error. In the following, the first round of LIAs conducted will be called the "first test series", and the repetition of disagreeing LIAs will be named the "second test series".

Table 4. Allocation of serum samples based on results obtained with LIA B and to its to the manufacturer's instructions.

Allocation Categories	Canine Serum	Equine Serum
neg	0 AG lines or AG lines \leq COC or VlsE AG line = COC or 0–1 AG line (except VlsE and OspA) \geq COC	0 AG lines or AG lines \leq COC or 0–2 AG line (except VlsE) \geq COC
equiv	2–3 AG lines \geq COC (except VlsE and OspA)	3 AG line (except VlsE) \geq COC or VlsE AG line and 0–2 AG lines \geq COC
pos	VlsE > COC or VlsE \geq COC and 1 AG line (except OspA) or \geq 4 AG lines (except VlsE and OspA)	VlsE AG line and \geq 3 AG lines \geq COC or VlsE AG line and DbpA AG line and 1 AG line or \geq 4 AG lines \geq COC (except VlsE)
vac	OspA AG line isolated or OspA AG line and \geq 1 AG line (beside VlsE) or OspA AG line and VlsE AG line isolated = COC	-
vac + pos	OspA AG line and VlsE AG line isolated \geq COC or OspA AG line and VlsE AG line and \geq 1 AG line	-

OspA AG line was considered as non-specific AG line in equine immunoreactions. Equine serum samples with an OspA AG line were evaluated once according to the equine evaluation protocol by simply considering the OspA AG line as non-specific for equine immunoreactions and thus not counting this AG line and afterward evaluated according to the evaluation protocol for vaccinated or vaccinated and infected dogs. AG line, antigen line; COC, cutoff control AG line.

2.3. Statistical Methods

The intensity for each single signal on the LIA strips and the overall results were listed, organized, and analyzed for each sample with Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Color reactions of the protein-antibody-complexes for each AG line and overall results were compared for each sample. The statistical analysis was performed using the program R (R i4.1.3., R Foundation for Special Computing, Vienna, Austria). Samples were analyzed using the Cohen's squared kappa test to give more weight to dissimilar results [38]. κ^2 depicts the agreement of the coloration of the single AG lines between the two LIAs for each subgroup of sera. The degree of agreement in coloration was categorized in "none to slight" ($\kappa^2 < 0.2$), "fair" ($\kappa^2 = 0.21-0.40$), "moderate" ($\kappa^2 = 0.41-0.60$), "substantial" ($\kappa^2 = 0.61-0.80$), and "almost perfect" ($\kappa^2 = 0.81-1.00$). Therefore, a high value for κ^2 can occur in negative samples, as κ^2 does not reflect the intensity of coloration of single AG lines but only its agreement in coloration comparing the two tests.

3. Results

3.1. Canine Serum Samples

In the first test series with both LIAs that included 200 canine sera, the agreement of the results between the two assays was 92.5% ($n = 185$). The remaining serum samples

with divergent results ($n = 13$; Table 5) and serum samples for which LIA A could not automatically assign a result category due to a COC above the maximum level ($n = 2$) were then retested under the same conditions.

Table 5. Canine samples with divergent results in the two LIAs. KELA-results below 100 are considered as negative. KELA levels above 100 need confirmation by a LIA.

Sample ID	Group	LIA A	LIA B	KELA Values
RKS-B-5365-C	Negative	neg	pos	138.9
RKS-B-7240-C	Negative	pos	neg	151.7
RKS-B-7279-C	Negative	vac	neg	125.6
RKS-B-8564-C	Negative	neg	pos	127.0
RKS-B-5119-C	Positive	pos	vac + pos	394.6
RKS-B-7996-C	Positive	pos	equiv	103.7
RKS-B-8113-C	Positive	pos	equiv	243.1
Hanka	Vaccinated	vac + pos	vac	613.6
RKS-B-5512-C	Vaccinated	neg	vac	234.9
RKS-B-8324-C	Vaccinated	vac + pos	vac	580.9
S98-5/1 *	Control sera	pos	neg	63.3
A93-3/3 *	Control sera	neg	vac	383.2
A93-3/4 *	Control sera	vac	neg	311.2

* Dogs used for *Bbsl* infection studies at Cornell University (Ithaca, NY, USA) [34–36].

The accordance of the results between the two LIAs including the second test series was 94.0% in total ($n = 188$; Table 6). In the second test series, two samples tested with LIA A (i.e., RKS-B-5512-C and S98-5/1) and one sample tested with LIA B (i.e., RKS-B-5365-C) displayed different results when compared to the first test series. The automatic scan of LIA A was not successful for two strips (i.e., RKS-B-8492-C and RKS-B-5707-C) in both test series, as its COC was above the maximum level the scanner was able to handle. Those strips had to be evaluated visually by the examiner as advised in the manufacturer's instructions. Results from those two strips agree with the results from LIA B.

Table 6. Defined *Bbsl*-serostatus of dogs (Groups; $n = 200$) and allocated results after the second round of serologic testing using LIA A and LIA B.

LIA Results \ Groups		Positive ($n = 50$)	Negative ($n = 50$)	Vaccinated ($n = 50$)	Control Sera ($n = 50$) ¹
LIA A	pos	47	2	0	12
	equiv	0	0	0	0
	neg	3	47	0	20
	vac	0	1	50 **	18
LIA B	pos	45 *	2	0	12
	equiv	2	0	0	0
	neg	3	48	0	20
	vac	0	0	50 ***	18

* One infected dog showed additional AG lines for vaccination. ** Three vaccinated dogs showed additional AG lines for infection. *** One vaccinated dog showed additional AG lines for infection. ¹ Dogs used for *Bbsl* infection studies at Cornell University (Ithaca, NY, USA) [34–36].

Overall, LIA A reacted stronger than LIA B with sera from the group "positive" (Figure 1B). Reactions on LIA B were stronger in color when tested with sera that originated from uninfected and vaccinated dogs (Figure 1A). The sera from the group "control sera" reacted in the same way with the antigens of the two LIAs (Figure 1D). As shown in Figure 1C, the dogs vaccinated against *Bbsl* reacted strongly to the OspA antigen of both tests.

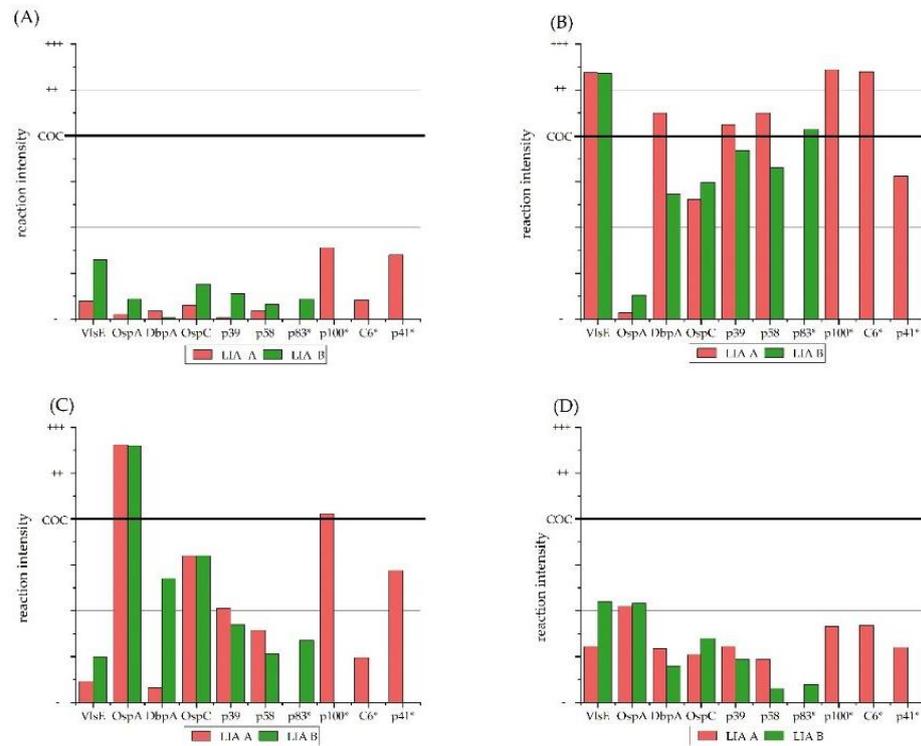


Figure 1. Degree of antigen-antibody reactions on LIA A and LIA B resulting from testing with canine serum samples. Ranking from reaction as “–”, less than the cut-off control COC; “+”, equal to the COC; “++”, strong; and “+++”, very strong reactions. Antigens marked with * are unique for the respective LIA. Degree of antigen-antibody reactions of sera (A) from group “negative”; (B) from group “positive”; (C) from group “vaccinated”; (D) from group “control sera”. COC, cut-off control; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; OspA, outer surface Protein A; DbpA, decorin binding protein A; OspC, outer surface protein C; BmpA, borrelia membrane protein A; p, protein; C₆, C₆ peptide.

The statistics showed significant differences in the reactions of canine serum antibodies to antigens on the two LIAs (Table 7). Results observed by the two LIAs displayed an almost perfect overall agreement of $\kappa^2 = 0.936$. Regarding the four canine groups used in this study, the two LIAs agreed least in the group “negative” ($\kappa^2 = 0.219$) and matched best in the group “control sera” ($\kappa^2 = 0.895$). Considering AG lines in the four canine groups, the lowest agreement ($\kappa^2 = 0.084$) was observed at the DbpA/p18 AG line with sera of dogs vaccinated against *Bbsl*. The OspA antigen reaction for the group “control sera” achieved the highest κ^2 with a value of 0.956.

3.2. Equine Serum Samples

After screening 200 equine serum samples with both LIAs in the first test series, the accordance of the results was 57.5% ($n = 115$). Of these 200 equine serum samples, 17 samples (8.5%) could not be evaluated in the scanning process of LIA A, as the COC was above its maximum level. These LIA strips were then evaluated visually by the examiner as suggested in the manufacturer’s instructions. Most results disagreeing between the two LIAs were observed in the group “equivocal” ($n = 33$), followed by the group “control sera—vaccinated” ($n = 21$), the group “positive” ($n = 20$), and the group “negative”

($n = 11$). Four equine samples were recognized by the scanner as canine samples, displaying false results for RKS-B-6841-E, RKS-B-5283-E, and RKS-B-6238-E. While LIA B specifically states that OspA is a non-specific AG line in equine immunoreactions, LIA A seems to count the OspA AG line as specific for equine infections displaying equivocal or positive results for 18 horses and disagreeing results for 8 horses (Table 8). As neither the manual for LIA A nor for LIA B instructs on how to evaluate vaccinated horses, we reevaluated all horses' sera displaying reactions for the OspA AG according to the manufacturer's instructions for vaccinated and vaccinated and infected dogs.

Table 7. κ^2 for comparable antigen-antibody-complex signals on LIA A and B when canine or equine sera were applied. The degrees of agreement are categorized into "none to slight" ($\kappa^2 < 0.2$), "fair" ($\kappa^2 = 0.21-0.40$), "moderate" ($\kappa^2 = 0.41-0.60$), "substantial" ($\kappa^2 = 0.61-0.80$), and "almost perfect" ($\kappa^2 = 0.81-1.00$). A high value for κ^2 does not represent a high reaction intensity but merely a high agreement between the two LIAs.

Antigen Group	VlsE	OspA	DbpA/p18	OspC	BmpA/p39	p58
can _{neg}	0.236	0.111	0.331	0.123	0.560	0.580
can _{pos}	0.852	0.147	0.156	0.645	0.850	0.574
can _{vacc}	0.411	0.460	-0.084	0.772	0.577	0.464
can _{con}	0.777	0.956	0.096	0.805	0.785	0.508
equ _{neg}	0.575	0.123	0.572	0.254	0.169	0.414
equ _{pos}	0.636	0.084	0.358	0.315	0.565	0.445
equ _{vacc}	0.665	0.668	0.015	0.559	0.523	0.234
equ _{equiv}	0.367	0.083	0.186	0.560	0.551	0.459

can_{neg}, canine sera from the group "negative"; can_{pos}, canine sera from the group "positive"; can_{vacc}, canine sera from the group "vaccinated"; can_{con}, canine sera from the group "control sera" [34–36]; equ_{neg}, equine sera from the group "negative"; equ_{pos}, equine sera from the group "positive"; equ_{vacc}, equine sera from the group "control sera—vaccinated"; equ_{equiv}, equine sera from the group "equivocal"; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; OspA, outer surface protein A; DbpA, decorin binding protein A; OspC, outer surface protein C; BmpA, borrelia membrane protein A; p, protein. The highest values for κ^2 for each AG line and subgroup are written in bold.

Table 8. Equine serum samples with divergent results in the LIA A due to the recognition of the OspA band as specific for *Bbsl*-infection.

Sample ID	Group	LIA A with OspA *	LIA A without OspA **	LIA B	KELA Values
S4-8 ¹	Control sera—vaccinated	equiv	neg	neg	654.3
S4-32 ¹	Control sera—vaccinated	pos	equiv	equiv	735.0
S4-180 ¹	Control sera—vaccinated	pos	equiv	equiv	688.6
S7-43 ¹	Control sera—vaccinated	equiv	neg	neg	728.9
S7-44 ¹	Control sera—vaccinated	pos	equiv	neg	633.8
S7-58 ¹	Control sera—vaccinated	equiv	neg	neg	725.4
S7-61 ¹	Control sera—vaccinated	pos	equiv	neg	694.8
S1-5 ¹	Control sera—vaccinated	equiv	neg	pos	568.4

* Evaluation of LIA A strips according to the manufacture's instruction considering OspA AG lines indicative for infection, ** Evaluation of LIA A strips according to the manufacture's instruction considering OspA AG lines not indicative for infection and not for vaccination. ¹ Horses experimentally vaccinated with the vaccine EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) [37].

Even though in the manual for LIA B a signal for OspA AG is considered non-specific for an infection with *Bbsl*-complex species, the evaluation of equine sera displaying a reaction for OspA AG resulted in many false-positive outcomes (Table 9). Nevertheless, reactions to four or more further AG lines (i.e., OspC, DbpA, BmpA, p39, or p83) occurred, which allowed the categorization of the samples as "pos" according to the manufacturer's instruction. As the use of a lysate vaccine against LB in horses might lead to the development of antibodies against various borrelial outer surface proteins that are expressed

by borreliae in vitro, immunocomplex reactions on these AG lines in combination with a reaction to the OspA AG line can occur in vaccinated animals and should—as in the evaluation scheme of dogs—not be counted as specific for infection. Only the VlsE and C₆ AG lines can be evaluated as specific for an infection with *Bbsl* species, as VlsE is only expressed by active borreliae in vivo. Similar to dogs, horses with concurrent reactions for OspA and VlsE or C₆ AG should be categorized as “vac + pos”.

Table 9. Equine serum samples with OspA AG signals and results considered “pos” on LIA B due to the recognition of ≥ 4 AG lines (beside VlsE and OspA) that are considered as non-specific for an infection with *Bbsl* complex species in vaccinated dogs.

Sample ID	Group	LIA A	LIA B	KELA Values
S4-5 ¹	Control sera—vaccinated	pos	pos	584.0
S4-26 ¹	Control sera—vaccinated	pos	pos	659.9
S4-30 ¹	Control sera—vaccinated	pos *	pos	709.4
S4-31 ¹	Control sera—vaccinated	pos	pos	697.8
S4-176 ¹	Control sera—vaccinated	pos **	pos	722.4
S7-86 ¹	Control sera—vaccinated	pos *	pos	731.8
S1-5 ¹	Control sera—vaccinated	equiv	pos	568.4
S4-28 ¹	Control sera—vaccinated	neg	pos	661.2
S5-31 ¹	Control sera—vaccinated	neg	pos	646.9

* LIA strips with a reaction to the VlsE or C₆ AG; ** only case tested with LIA A; reactions to four AG lines beside VlsE and OspA were considered as “pos”. ¹ Horses experimentally vaccinated with the vaccine EquiLyme® (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) [37].

When a reaction for OspA AG occurred on LIA strips with equine serum samples, both technical manuals supplied no information on how to evaluate these strips at the time of testing. As we were aware of the vaccination against LB, the reaction of OspA must have occurred due to the vaccination with the specific vaccine. Therefore, we categorized the equine samples according to the manufacturer’s instructions provided for dogs (Supplementary Material Table S1). This way, an accordance of 78% was reached in the group “control sera—vaccinated”.

Afterward, LIA strips exposed to equine sera and then recognized as canine samples were correctly evaluated according to the equine evaluation scheme, and samples for which OspA was considered non-specific for infection were categorized according to the evaluation scheme for dogs. In consequence, the agreement between the two LIA rose from 57.5% ($n = 115$) to 63.0% ($n = 126$).

All serum samples with divergent results ($n = 85$) were retested in a second test series under the same conditions. Thus, the comparability of the results between the two LIAs grew to 65.5% ($n = 131$); vaccinated horses were evaluated like vaccinated dogs, and LIA strips exposed to equine sera recognized as canine samples were evaluated according to the equine evaluation scheme. In the second test series, changes in three additional samples in LIA A and two additional samples in LIA B led to concurrent results. Additionally, the equine samples in which the COC was in the first test run too high for evaluation could now be evaluated with the scanner aside from two horses that displayed a COC too high for evaluation in both test series (S4-28 and RKS-B-10899-E). These horses were then evaluated visually by the examiner. As already described in the first test series, a few horses’ sera

were still recognized as dog samples, of which three sera were evaluated as canine in both test series (RKS-B-6841-E, RKS-B-5283-E, and RKS-B-6238-E).

The group “equivocal” ($n = 50$) displayed the most discrepancies (58%), followed by the groups “positive” (36%), “negative” (20%), and “control sera—vaccinated” (20%).

Considering the extent of coloration of AG lines on the LIA strips, the p100-antigen line on LIA A developed the strongest reaction compared to all other antigens of both LIAs in all four groups (Figure 2); further, p100 was equal to or higher than the COC on 170 of the 200 equine LIA strips. LIA A produced a slightly stronger color reaction in the group “negative” (Figure 2A). Both LIAs showed comparable antibody reactions for groups “positive” and “equivocal” (Figure 2B,C); serum samples from group “equivocal” showed stronger signals for the OspC and p39 AG on LIA B, while p58 and DbpA were stronger on LIA A. As illustrated in Figure 2D, samples from “control sera—vaccinated” showed strong signals for OspA on both LIAs.

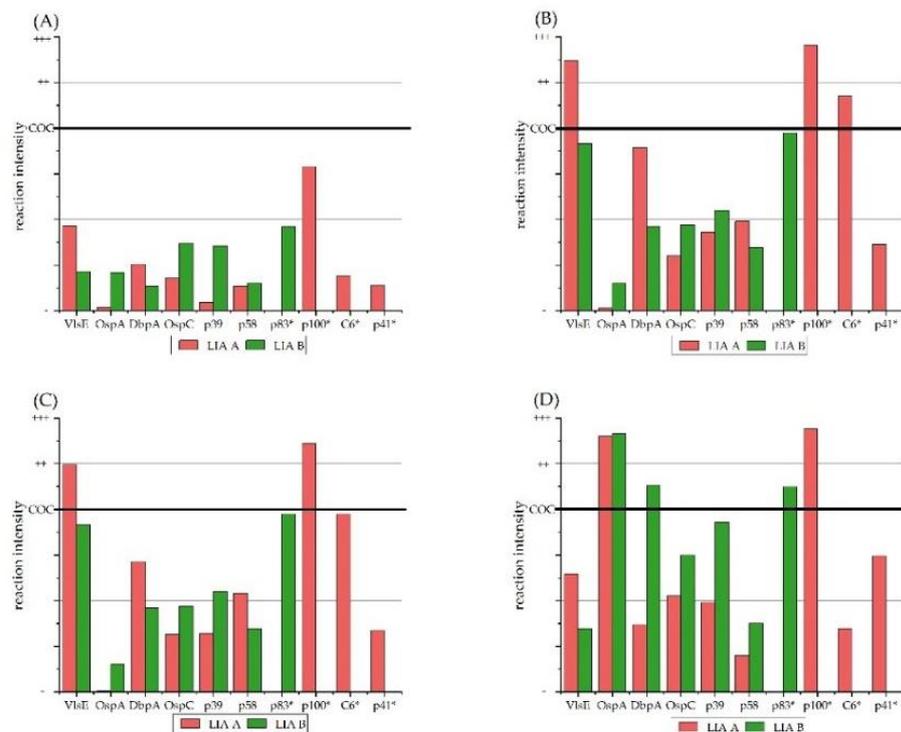


Figure 2. Degree of antigen-antibody reactions on LIA A and LIA B resulting from tests with equine serum samples. Ranking from reaction as “–”, less than the cut-off control COC; “+”, equal to the COC; “++”, strong; and “+++”, very strong reactions. Antigens marked with * are unique for the respective LIA. Degree of antigen-antibody reactions of sera (A) from group “negative”; (B) from group “positive”; (C) from group “equivocal”; (D), from “control sera—vaccinated”. COC, cut-off control; VlsE, variable major protein-like sequence expressed; OspA, outer surface Protein A; DbpA, decorin binding protein A; OspC, outer surface protein C; BmpA, borrelia membrane protein A; p, protein; C₆, C₆ peptide.

The statistical analysis (Table 7) shows significant differences in the antibodies’ reaction patterns for single serum samples based on the results derived from the two LIAs. Compared to canine sera, the rate of concordance for equine serum samples was generally

lower. All equine results displayed a substantial comparability at $\kappa^2 = 0.808$. Results for the group “control sera—vaccinated” displayed the highest degree of comparability ($\kappa^2 = 0.519$), except for the DbpA/p18 signal ($\kappa^2 = 0.015$). The results for the group “equivocal” agreed the least ($\kappa^2 = 0.223$), considering the signals reactions to DbpA/p18 ($\kappa^2 = 0.186$) and OspA ($\kappa^2 = 0.083$) were the least comparable. Groups “positive” and “negative” showed a moderate degree of comparability with $\kappa^2 = 0.450$ and $\kappa^2 = 0.457$, respectively.

4. Discussion

This study was designed to compare two LIAs regarding sensitivity, specificity, overall results, and laboratory handling of canine and equine serum samples.

4.1. Sensitivity, Specificity, and Overall Results

For LB in dogs, it is essential to correctly detect silent carriers of borreliae, as dogs and owners live in a close relationship [39]. The estimated growth of the tick population due to more favorable climate conditions in the next years will lead to a higher number of canine infections [40]. When dogs are neither vaccinated nor protected or tested and treated against LB, tick attachment and the possible infection of uninfected nymphal stages on these infected dogs will allow more infected ticks to reach gardens and greens, where deer and other wildlife are not residing. Nymphs will then molt to adults and possibly bite and may infect humans. On the other hand, a false-positive diagnosis of LB will lead to the unnecessary treatment of dogs with antibiotics with unnecessary side effects and the risk of antibiotic-resistance development in bystander bacteria.

In this context, both LIAs evaluated in his study seem to be highly comparable (94.0%) and appropriate for diagnostic purposes with canine serum samples. For the group of “canine control sera”, the best agreement between the results of the two LIAs could be observed ($\kappa^2 = 0.895$). Both LIAs produced twelve serum samples from the group “canine control sera—positive” identified correctly as “pos” and also nineteen serum samples from the group “canine control sera—negative” accurately identified as “neg”. Both LIAs allocated one serum sample each from the “canine control sera—vaccinated” as falsely “neg” and the residual nineteen serum samples correctly as “vac” (Table 6). As the “canine control sera” originate from dogs with a confirmed infection status, and both LIA tested different vaccinated canine serum samples as “neg”, we could clearly identify these two results as false. The group “positive” ($n = 50$) displayed the second-best agreement ($\kappa^2 = 0.882$). However, here, LIA A tested 47 serum samples correctly as “pos”, while LIA B tested 45 serum samples correctly as “pos” (Table 6). This disagreement between the previous allocation and the LIAs might be due to the previously used tests or might even be a previous case of human error. Next, the second-least agreement of the results between the two LIAs ($\kappa^2 = 0.489$) was observed for the group “vaccinated” ($n = 50$) even though both LIAs allocated the 50 serum samples correctly as “vac” (Table 6). The results for the group “negative” ($n = 50$) agreed with $\kappa^2 = 0.219$, while LIA A allocated 47 serum samples correctly as “neg” and LIA B 48 serum samples as “neg”; both produced two “false-positive” in this group. Of these “pos”-labeled samples, one was “pos” in both LIAs with 256.6 KELA units (Table 6). The other two “pos” dogs had either 138.9 or 151.7 KELA units. In this case, it is difficult to conclude which test produced an accurate result. In general, seronegative dogs display KELA levels below 100 KELA units. Thus, it is reasonable to conclude that sample with agreeing “pos” results from the two LIAs might have been allocated falsely beforehand. Further, we observed that on LIA A, canine serum samples reacted less strongly with VlsE than on LIA B in groups “negative”, “vaccinated”, and “control sera”. However, in the previous three groups, a stronger reaction against the C₆ peptide was visible. In the group “positive”, both LIAs produced strong color reactions to VlsE and in LIA A equally strong color reactions to C₆. Therefore, in our opinion, separating C₆ and VlsE does not add extra value to the performance of a LIA, which disagrees with a study conducted with dogs by Breu and Müller (2017) [41]. In this study, over 25% of 236 positive canine sera displayed

disagreeing results between the C₆ and the VlsE AG [41]. In our study, only 8 of the 200 canine serum samples (4%; RKS-B-7240-C, RKS-B-8484-C, RKS-B-5813-C, RKS-B-7973-C, RKS-B-7996-C, RKS-B-8324-C, S98-5/1, and S98-5/4) showed diverging results between the C₆ and the VlsE AG on LIA A. On LIA B, three of these five dog sera (RKS-B-8324-C, RKS-B-7669-C, and S98-5/1) produced different results when compared to LIA A (Table 6). However, in our opinion, both tests are highly suitable for LB diagnostic for dogs, and the addition of the C₆ antigen does not influence the results negatively.

In horses, the existence of clinical LB is controversially discussed, and if it exists, clinical signs are highly diverse, ranging from neuroglial disorders to lameness, uveitis, and cutaneous pseudolymphoma [42–44]. Yet, many studies in various countries around the world describe and confirm infections of horses with *Bbsl* organisms [45–47]. Like dogs, horses are a part in the infectious chain of *Bbsl*-complex species [48]. However, equines probably play a lesser role in the indirect transmission to humans, as horses and humans live in a remoter relationship than humans and dogs. Due to the recommendation to treat only seropositive horses with antibiotics that at the same time display clinical signs and in which all other diseases can be ruled out [42], the impact of false-negative results is not as high as in dogs.

For equine serum samples, the two LIAs displayed concordant results for 65.5% of the sera. Again, the results from the group “control sera—vaccinated” agreed the most ($\kappa^2 = 0.519$), with 47 serum samples correctly allocated as “vac” by LIA A and 48 serum samples correctly allocated as “vac” by LIA B. The second-best agreement was observed for the group “negative” ($\kappa^2 = 0.457$). Here, LIA B displayed 47 “neg” results, while LIA A produced only 38 “neg” (Table 10). The 50 samples in group “positive” had been assigned to this group by evaluating these sera with the assay “Borrelia Veterinär plus OspA LINE” (Virotech GmbH) or its predecessor model. In our study, 17 of these sera tested positive on LIA B and 29 on LIA A (Table 10). An explanation for the discrepant test results could be the use of a predecessor model of the “Borrelia Veterinär plus OspA LINE” (Virotech GmbH), a Western blot used between 2006 and 2011. This WB contained 16 AG lines, which is 9 AG lines more than current LIA B. Reactions with those nine antigens might have contributed to more positive results. For some of these proteins, e.g., the p41, cross-reactions with spirochetes such as relapsing fever borreliae have been described, which limits their diagnostic value [30,49,50]. Another explanation for discrepant results of sera could be the subjective assessment by the technical person in the case of LIA B and the predecessor model of Borrelia Veterinär plus OspA LINE (Virotech GmbH), making human error more likely in these tests. LIA A’s evaluation via a scanning system may prevent varying results, particularly if more than one person evaluates the assays. In the group “equivocal”, the highest number of diverging results ($n = 29$) occurred, and the color reaction and overall results were the least comparable between the two LIAs (Table 7). LIA A produced 25 seropositive horses, while LIA B produced only 6. Considering all samples, LIA A produced a total of 77 positive serum samples, while LIA B produced a total of 32.

High numbers of false-positive samples are concerning and show that the serologic assessment of equine sera for *Bbsl*-specific antibodies is challenging and should be improved to reduce the overdiagnosis and unrequired antibiotic treatment of horses. This is especially important for the animal, as many long-term antibiotic treatment regimens can lead to the development of diarrhea, colitis, and might even cause the needless death of the equine [51,52]. Further, long-term antibiotic treatment in horses is generally performed by intravenous or intramuscular injection of the compound, as almost all antibiotics recommended and available for equine LB [42]—except for tetracycline—must be applied parenterally. Continuous intravenous or intramuscular injection often leads to thrombophlebitis [53] and may induce abscesses.

Table 10. Defined serostatus of horses (groups; $n = 200$) and allocated results using LIA A and LIA B. (Specific samples were tested two time as described above.)

LIA Results \ Groups		Positive ($n = 50$)	Equivocal ($n = 50$)	Negative ($n = 50$)	Control Sera-Vaccinated ¹ ($n = 50$)
		LIA A	pos	29	25
equiv	20		22	6	1
neg	1		3	38	2
vac	0		0	0	47*
LIA B	pos	17	6	1	0
	equiv	28	23	2	1
	neg	4	21	47	1
	vac	1*	0	0	48**

* 18 vaccinated horses also showed signals for infection. ** 8 vaccinated horses also showed signals for infection.
¹ Horses experimentally vaccinated with the vaccine EquiLyme[®] (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Germany) [37].

The consideration of OspA AG as specific for borrelial infection is probably the main disadvantage of LIA A [17,54]. The development of antibodies against OspA is specific for vaccination [32], as borreliae express OspA only while residing in the tick's intestine [55]. When *Ixodes* spp. ticks start to feed blood on the mammalian host, borreliae change their outer-surface antigen expression pattern, especially from OspA to OspC [56]. Thus, the host will encounter not many *Bbsl* organisms expressing OspA during the transmission and thus will not develop antibodies against OspA due to the infection [34]. In contrast, for canine serum samples both technical manuals provide precise evaluation schemes. Dogs with OspA-specific antibodies and against antigens other than VlsE/C₆ are then considered "vac", and when the VlsE/C₆ AG is also visible, the sera come from "vac + pos" dogs. Since lysate vaccines against LB were used in the horses [37] that were included in this study, antibody reactions to various borrelial outer surface proteins must be considered [35]. In contrast, antibodies against VlsE and C₆ antigens are associated with an active infection with *Bbsl* organisms, as VlsE is expressed in vivo only [27]. Further, the *vls* gene is expressed on the linear plasmid lp28-1 [57], which might get lost during passaging of *Borrelia* spp. in vaccine production [58]. When this plasmid is lost, borreliae will therefore lose the ability to express the VlsE lipoprotein, and thus, no antigen reaction to VlsE occurs in vaccinated animals [37,59,60]. This assumption would allow the evaluation of vaccinated horses according to the canine evaluation protocol; however, further studies with a larger number of experimentally vaccinated horses might be helpful.

We furthermore recommend reducing the number of AG lines, including only these that are highly specific for infection or vaccination with *Bbsl*.

p100 and p83 are associated with either the protoplasmic cylinder [61] or the flagella [62] of borreliae and are highly sensitive antigens for late stages of *Bbsl* infection [20,63]. p83/100 are similar for *Bbsl* and *B. afzelii* although these proteins show differences when compared to *B. garinii* [64]. However, in a comparison of the N-terminal amino acid sequences of p100 and p83, no differences in the amino acid sequence were found, and it was concluded that p100 and p83 are identical [65]. In this study, p100 used on LIA A showed the strongest color reactivity in all equine serum test groups. LIA A strips incubated with equine sera produced reactions to p100 in 170 cases, which accounts for 85.0% of the 200 horses. This non-specificity of p100 might be one reason for a high portion of horses identified as "pos" (40.7%) compared to LIA B with only 23.3%. However, when we compared the signals of the similar p83 AG on LIA B, a disproportionate high number of reactions to this AG ($n = 122$; 61%) was observed as well. Consequently, we compared the numbers of reactions to the p100 and p83 AG line with the those to other AG lines found on the respective LIA (Supplementary Material Table S2 and Figure 3).

When all color reactions on the AG lines (i.e., degree of color reaction (Figures 1 and 2) and overall number of reactions (Figure 3)) are considered, it seems that the p83 and p100

AG react very often and may falsely call for a *Bbsl* infection in horses and thus should be omitted from diagnostic LIA strips to avoid false-positive results in horses.

Of all 200 tested equine samples, only two samples (RKS-B-5442-E, RKS-B-5558-E) reacted as positive for the C₆ and negative for VlsE on LIA A. One of the two samples (RKS-B-5442-E) was diagnosed “negative” in LIA B but equivocal in LIA A, while the other sample (RKS-B-5558-E) was categorized as “equivocal” in both LIAs. On the other hand, the VlsE AG appeared isolated without a reaction against C₆ in 37 equine serum samples. To the best of our knowledge, there is no literature available describing the heterogeneity of equine immune responses to VlsE or C₆. The C₆ peptide is a synthetically produced part (IR6) of the VlsE lipoprotein. Regarding different invariable regions of the VlsE lipoprotein, X-ray crystallography of VlsE displayed a limited surface exposure of IR6 [66]. This study suggests that in horses, more antibodies bind to the complete VlsE surface than to the limited surface of C₆ peptide. Therefore, in the authors’ opinion, there seems to be no additional value and probably no considerable disadvantage of including C₆. However, as depicted in Figure 3, considerably more LIA A strips displayed a reaction to VlsE than LIA B strips (LIA A: *n* = 122; LIA B: *n* = 85). This observation might indicate that the reactivity to the VlsE AG is too high in LIA A, as only 50 horses were seropositive, and 50 additional horses were equivocal. This might be an additional reason why LIA A produces more positive results than LIA B (Table 10). In conclusion, the interpretations of results from LIAs exposed to equine sera are still challenging, and improvements concerning OspA and the selection of AG are needed.

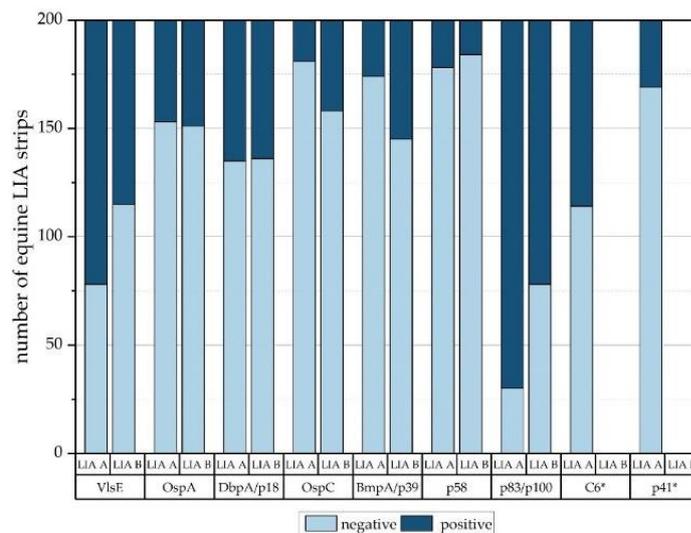


Figure 3. Number of equine AG lines that displayed positive (equal or higher than COC) or negative color reactions on the LIA strips of both LIAs. Antigens marked with * are unique for the respective LIA.

4.2. Handling of LIAs

In terms of handling and implementation of the tests in the laboratory, there are hardly any differences. LIA A features a longer incubation time compared to LIA B (45 min for serum and conjugate versus 30 min); the incubation time for the substrate is two minutes shorter for LIA A (ten minutes versus twelve minutes). An advantage of LIA A is its multi-species conjugate; in contrast to LIA B, the test kit from LIA A contains one conjugate used for both canine and equine serum samples. Furthermore, it is unnecessary to mix the conjugate from LIA A with washing buffer and conjugate concentrate before testing. In our view, the workflow of LIA A is more user-friendly.

LIA A provides a scanner for the evaluation scheme. During the scanning process, a combined evaluation sheet of all samples and an extra folder for each sample and each strip with its AG lines' color intensity are created. After scanning, the color reaction for each AG line is displayed as a number from 0 to 9. In contrast, LIA B is evaluated visually by the examiner by comparing the AG line on the test strip with the COC. In the authors' opinion, the evaluation via a scanning system is the main advantage of LIA A, allowing a precise evaluation of samples and thus comparability. LIA B is prone to human error, and evaluation might change according to the evaluator and the light conditions. Therefore, the evaluation as conducted in LIA A seems to be most suitable for the scientific field, as human error is mostly ruled out, and the number values provided by the program allow a more precise and easy statistical evaluation. A further advantage of LIA A is the fact that results for each sample are displayed in an extra folder, and this sheet can be sent directly to the veterinary clinic or diagnostic facility as a medical report. Then again, when the scanning process for LIA A fails—as it did in this study in 2 dogs and 17 horses—the visual evaluation by the examiner is challenging, as the COC is on the same strip as the sample AG lines. A visual examination and thorough comparison were possible only for the first two to three AG lines next to the COC; all other AG lines could only be judged imprecisely. Furthermore, LIA A's scanning system had problems when strips were incubated with hemolytic sera. These hemolytic sera produced speckles on the nitrocellulose membrane concealing the protein signals. In hemolytic sera, the concentration of intracellular components of erythrocytes and other blood cells is released into the extracellular space of the blood [67]. These components may bind on the nitrocellulose membrane of a LIA strip [68]. The nitrocellulose membrane of LIA A seemed to be affected more strongly by this phenomenon than the membrane of LIA B. These speckled discolorations complicated the identification of antigen-antibody reactions in LIA A. In the scanning process of these speckled strips, equine samples were identified as canine samples as the canine control band seemingly reacted, or the scanner mistook a speckle as an antigen-antibody-complex reaction.

Dried strips of LIA B showed a slight purple discoloration. However, this had no impact on the evaluation.

5. Conclusions

Both tests are reliable assays for the diagnosis of LB in dogs, considering an agreement of 94.0%. For equine serum samples, the agreement was 65.5%. This result clearly shows that the serologic diagnosis of LB with equine sera is still challenging. Both LIAs should improve their interpretation of sera from vaccinated horses, and especially in the case of LIA A, the consideration of the OspA AG as specific for infection must be changed (current information on the LIA A manufacturer's website reconsiders the OspA AG role during *Bbsl* infection, and an evaluation scheme for vaccinated horses has been provided). Regarding test specificity, LIA B seems to be more reliable and produced fewer false-positive results. The test protocols are similar and allow no preference for a specific LIA. The evaluation of strips by a scanner makes LIA A the more adequate choice in a scientific background, as it is not prone to human error and displays higher comparability of evaluations and easier application for statistics. However, the evaluation scheme for LIA A in the case of vaccinated horses still needs improvement.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/vetsci9110633/s1>, Table S1: Equine LIA strips evaluated according to manufacturer's instructions for canines; Table S2: Positive and negative reactions of AG lines on both LIAs.

Author Contributions: Conceptualization, R.K.S. and S.C.D.; methodology, S.C.D. and S.H.; software, S.C.D.; validation, R.K.S. and J.W.; formal analysis, S.C.D., S.H., A.W. and J.W.; investigation, S.C.D.; resources, R.K.S.; data curation, S.C.D. and J.W.; writing—original draft preparation, S.C.D.;

writing—review and editing, R.K.S., S.U. and J.W.; visualization, J.W.; supervision, R.K.S.; 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: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Carola Sauter-Louis for providing the code for the statistic test and for much-appreciated help in conducting the statistics.

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

References

- Angelou, A.; Gelasakis, A.I.; Verde, N.; Pantchev, N.; Schaper, R.; Chandrashekar, R.; Papadopoulos, E. Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barth, C.; Straubinger, R.K.; Sauter-Louis, C.; Hartmann, K. Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. *Berl. Münchener Tierärztliche Wochenschr.* **2012**, *125*, 337–344.
- Gerber, B.; Eichenberger, S.; Wittenbrink, M.M.; Reusch, C.E. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: A possible breed predisposition. *BMC Vet. Res.* **2007**, *3*, 15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Funk, R.A.; Pleasant, R.S.; Witonsky, S.G.; Reeder, D.S.; Werre, S.R.; Hodgson, D.R. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses presented for coggins testing in Southwest Virginia and change in positive test results approximately 1 year later. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 1300–1304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wagner, B.; Erb, H.N. Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Prev. Vet. Med.* **2012**, *107*, 275–279. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Barbour, A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* **1984**, *57*, 521.
- Preac-Mursic, V.; Wilske, B.; Reinhardt, S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1991**, *10*, 1076–1079. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wang, G.; Wormser, G.P.; Schwartz, I. *Borrelia burgdorferi*. In *Molecular Medical Microbiology*; Sussman, M., Ed.; Academic Press: London, UK, 2001; pp. 2059–2092.
- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Nunes, M.; Parreira, R.; Carreira, T.; Inacio, J.; Vieira, M.L. 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*, 176–182. [\[CrossRef\]](#)
- Okeyo, M.; Hartberger, C.; Margos, G.; Straubinger, R.K.; Sing, A.; Fingerle, V. Comparison of methods for economic and efficient tick and *Borrelia* DNA purification. *Ticks Tick Borne Dis.* **2019**, *10*, 1041–1045. [\[CrossRef\]](#)
- Steere, A.C.; Grodzicki, R.L.; Kornblatt, A.N.; Craft, J.E.; Barbour, A.G.; Burgdorfer, W.; Schmid, G.P.; Johnson, E.; Malawista, S.E. The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **1983**, *308*, 733–740. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dressler, F.; Whalen, J.A.; Reinhardt, B.N.; Steere, A.C. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **1993**, *167*, 392–400. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F.; Benach, J.L.; Grunwaldt, E.; Davis, J.P. Lyme disease—A tick-borne spirochetosis? *Science* **1982**, *216*, 1317–1319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Steere, A.C.; Bartenhagen, N.H.; Craft, J.E.; Hutchinson, G.J.; Newman, J.H.; Rahn, D.W.; Sigal, L.H.; Spieler, P.N.; Stenn, K.S.; Malawista, S.E. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Ann. Intern. Med.* **1983**, *99*, 76–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wilkinson, H.W. Immunodiagnostic tests for Lyme disease. *Yale J. Biol. Med.* **1984**, *57*, 567–572. [\[PubMed\]](#)
- Gomes-Solecki, M.J.; Wormser, G.P.; Schriefer, M.; Neuman, G.; Hannafey, L.; Glass, J.D.; Dattwyler, R.J. Recombinant assay for serodiagnosis of Lyme disease regardless of OspA vaccination status. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 193–197. [\[CrossRef\]](#)
- Magnarelli, L.A.; Flavell, R.A.; Padula, S.J.; Anderson, J.F.; Fikrig, E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: Use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 169–173. [\[CrossRef\]](#)
- Hulinska, D. Diagnosis of Lyme borreliosis with western blotting. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* **1997**, *46*, 3–8.
- Wilske, B.; Fingerle, V.; Herzer, P.; Hofmann, A.; Lehnert, G.; Peters, H.; Pfister, H.W.; Preac-Mursic, V.; Soutschek, E.; Weber, K. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med. Microbiol. Immunol.* **1993**, *182*, 255–270. [\[CrossRef\]](#)
- Gauthier, D.T.; Mansfield, L.S. Western immunoblot analysis for distinguishing vaccination and infection status with *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease) in dogs. *J. Vet. Diagn. Investig.* **1999**, *11*, 259–265. [\[CrossRef\]](#)
- Wilske, B.; Fingerle, V.; Preac-Mursic, V.; Jauris-Heipke, S.; Hofmann, A.; Loy, H.; Pfister, H.W.; Rossler, D.; Soutschek, E. Immunoblot using recombinant antigens derived from different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Med. Microbiol. Immunol.* **1994**, *183*, 43–59. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

23. Engstrom, S.M.; Shoop, E.; Johnson, R.C. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33*, 419–427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zoller, L.; Cremer, J.; Faulde, M. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 937–944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hauser, U.; Lehnert, G.; Wilske, B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **1998**, *5*, 456–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hauser, U.; Wilske, B. Enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant internal flagellin fragments derived from different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato for the serodiagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Med. Microbiol. Immunol.* **1997**, *186*, 145–151. [[CrossRef](#)]
27. Marangoni, A.; Moroni, A.; Accardo, S.; Cevenini, R. *Borrelia burgdorferi* VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2008**, *27*, 349–354. [[CrossRef](#)]
28. Eicken, C.; Sharma, V.; Klabunde, T.; Lawrenz, M.B.; Hardham, J.M.; Norris, S.J.; Sacchetti, J.C. Crystal structure of Lyme disease variable surface antigen VlsE of *Borrelia burgdorferi*. *Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21691–21696. [[CrossRef](#)]
29. Zhang, J.R.; Norris, S.J. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene VlsE involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 3698–3704. [[CrossRef](#)]
30. Shin, S.J.; Chang, Y.-F.; Jacobson, R.H.; Shaw, E.; Lauderdale, T.-L.; Appel, M.J.; Lein, D.H. Cross-reactivity between *B. burgdorferi* and other spirochetes affects specificity of serotests for detection of antibodies to the Lyme disease agent in dogs. *Vet. Microbiol.* **1993**, *36*, 161–174. [[CrossRef](#)]
31. Jacobson, R.H.; Chang, Y.F.; Shin, S.J. Lyme disease: Laboratory diagnosis of infected and vaccinated symptomatic dogs. *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)* **1996**, *11*, 172–182. [[CrossRef](#)]
32. Chang, Y.F.; Appel, M.J.; Jacobson, R.H.; Shin, S.J.; Harpending, P.; Straubinger, R.; Patrican, L.A.; Mohammed, H.; Summers, B.A. Recombinant OspA protects dogs against infection and disease caused by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **1995**, *63*, 3543–3549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Barth, C.; Straubinger, R.K.; Krupka, I.; Müller, E.; Sauter-Louis, C.; Hartmann, K. Comparison of different diagnostic assays for the detection of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies in dogs. *Vet. Clin. Pathol.* **2014**, *43*, 496–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Straubinger, R.K.; Chang, Y.F.; Jacobson, R.H.; Appel, M.J. 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](#)] [[PubMed](#)]
35. Straubinger, R.K.; Dharma Rao, T.; Davidson, E.; Summers, B.A.; Jacobson, R.H.; Frey, A.B. Protection against tick-transmitted Lyme disease in dogs vaccinated with a multiantigenic vaccine. *Vaccine* **2001**, *20*, 181–193. [[CrossRef](#)]
36. Summers, B.A.; Straubinger, A.F.; Jacobson, R.H.; Chang, Y.F.; Appel, M.J.; Straubinger, R.K. Histopathological studies of experimental Lyme disease in the dog. *J. Comp. Pathol.* **2005**, *133*, 1–13. [[CrossRef](#)]
37. 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](#)]
38. Cohen, J. Weighted kappa: Nominal scale agreement with provision for scaled disagreement or partial credit. *Psychol. Bull.* **1968**, *70*, 213–220. [[CrossRef](#)]
39. Day, M.J. One health: The importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasites Vectors* **2011**, *4*, 49. [[CrossRef](#)]
40. Lindgren, E.; Gustafson, R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. *Lancet* **2001**, *358*, 16–18. [[CrossRef](#)]
41. Breu, D.; Müller, E. Heterogeneity of canine immune responses to *Borrelia burgdorferi* in a line immunoassay comprising recombinant VlsE and C6 peptide. *Tierarztl. Prax. Ausg. K Kleintiere Heimtiere* **2017**, *45*, 295–300. [[CrossRef](#)]
42. Divers, T.J.; Gardner, R.B.; Madigan, J.E.; Witonsky, S.G.; Bertone, J.J.; Swinebroad, E.L.; Schutzer, S.E.; Johnson, A.L. *Borrelia burgdorferi* Infection and Lyme Disease in North American Horses: A Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 617–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Browning, A.; Carter, S.D.; Barnes, A.; May, C.; Bennett, D. Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *Vet. Rec.* **1993**, *132*, 610–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. James, F.M.; Engiles, J.B.; Beech, J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2010**, *237*, 1180–1185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Bhide, M.; Yilmaz, Z.; Golcu, E.; Torun, S.; Mikula, I. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2008**, *15*, 85–90. [[PubMed](#)]
46. Durrani, A.Z.; Goyal, S.M. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses in Minnesota. *J. Anim. Plant Sci.* **2011**, *21*, 8–11.
47. Käsbohrer, A.; Schönberg, A. Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West). *Berl. Münchener Tierärztliche Wochenschr.* **1990**, *103*, 374–378.
48. Bae, J.M. Horses as a Potential Reservoir of Lyme Borreliosis in Jeju-do, Korea. *J. Prev. Med. Public Health* **2018**, *51*, 213–214. [[CrossRef](#)]
49. Bruckbauer, H.R.; Preac-Mursic, V.; Fuchs, R.; Wilske, B. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1992**, *11*, 224–232. [[CrossRef](#)]
50. Wilske, B.; Preac-Mursic, V.; Fuchs, R.; Schierz, G. Diagnostik der Lyme-Borreliose. *Diagnose & Labor* **1990**, *40*, 24–36.
51. Keir, A.A.; Stämpfli, H.R.; Crawford, J. Outbreak of acute colitis on a horse farm associated with tetracycline-contaminated sweet feed. *Can. Vet. J.* **1999**, *40*, 718–720.

52. Barr, B.S.; Waldridge, B.M.; Morresey, P.R.; Reed, S.M.; Clark, C.; Belgrave, R.; Donecker, J.M.; Weigel, D.J. Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 154–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dias, D.P.; de Lacerda Neto, J.C. Jugular thrombophlebitis in horses: A review of fibrinolysis, thrombus formation, and clinical management. *Can. Vet. J.* **2013**, *54*, 65–71. [[PubMed](#)]
54. Fawcett, P.T.; Rose, C.D.; Budd, S.M.; Gibney, K.M. Effect of immunization with recombinant OspA on serologic tests for Lyme borreliosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2001**, *8*, 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. 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](#)] [[PubMed](#)]
56. 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](#)]
57. Purser, J.E.; Norris, S.J. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13865–13870. [[CrossRef](#)]
58. O'Connor, T.P.; Esty, K.J.; Hanscom, J.L.; Shields, P.; Philipp, M.T. 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*, 458–462.
59. Liang, F.T.; Steere, A.C.; Marques, A.R.; Johnson, B.J.; Miller, J.N.; Philipp, M.T. 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. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 3990–3996. [[CrossRef](#)]
60. 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. *Vaccine* **2007**, *25*, 314–326. [[CrossRef](#)]
61. Luft, B.J.; Mudri, S.; Jiang, W.; Dattwyler, R.J.; Gorevic, P.D.; Fischer, T.; Munoz, P.; Dunn, J.J.; Schubach, W.H. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: An immunodominant protoplasmic cylinder antigen. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 4309–4321. [[CrossRef](#)]
62. Eiffert, H.; Schlott, T.; Hoppert, M.; Lotter, H.; Thomssen, R. Identification of an endoflagellar associated protein in *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Microbiol.* **1992**, *36*, 209–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Rasiah, C.; Rauer, S.; Gassmann, G.S.; Vogt, A. Use of a hybrid protein consisting of the variable region of the *Borrelia burgdorferi* flagellin and part of the 83-kDa protein as antigen for serodiagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **1994**, *32*, 1011–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Rössler, D.; Eiffert, H.; Jauris-Heipke, S.; Lehnert, G.; Preac-Mursic, V.; Teepe, J.; Schlott, T.; Soutschek, E.; Wilske, B. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Med. Microbiol. Immunol.* **1995**, *184*, 23–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ditton, H.J.; Neuss, M.; Zoller, L. Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *73*, 217–220. [[CrossRef](#)]
66. Embers, M.E.; Jacobs, M.B.; Johnson, B.J.; Philipp, M.T. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin. Vaccine Immunol.* **2007**, *14*, 931–936. [[CrossRef](#)]
67. Guder, W.G.; Ehret, W.; Da Fonseca-Wollheim, F.; Heil, W.; Müller-Plathe, O.; Schmitt, Y.; Töpfer, G.; Wisser, H.; Zawta, B. Die Qualität diagnostischer Proben. *Lab. Medizin* **2002**, *26*, 267–283. [[CrossRef](#)]
68. Sturgeon, C.M.; Viljoen, A. Analytical error and interference in immunoassay: Minimizing risk. *Ann. Clin. Biochem.* **2011**, *48*, 418–432. [[CrossRef](#)]

IV. WEITERE FORSCHUNGEN

Wie in Kapitel II beschrieben, gehören mittlerweile 21 verschiedene Borrelienspezies dem *Bbsl*-Komplex an, welcher ursächlich für die Entstehung einer humanen LB ist (CUTLER *et al.*, 2017). Bisher konnte nur für *Bbss* unter experimentellen Bedingungen die Entstehung klinischer Manifestationen, entsprechend denen einer humanen LB, bei Hunden bewiesen werden (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; STRAUBINGER *et al.*, 2000; CHANG *et al.*, 2001). Demgegenüber führte eine experimentelle Infektion von Ponys nicht zu klinischen Anzeichen (CHANG *et al.*, 2000a). Da weitaus mehr Borrelienspezies als nur *Bbss* humanpathogen sind, liegt der Verdacht nahe, dass neben *Bbss* auch weitere Borrelienspezies zu einer klinischen LB bei Tieren führen könnten. Methodisch in Frage kämen dabei Infektionsversuche, PCR-Nachweise und serologische Untersuchungen. Nachdem Infektionsversuche in diesem Maßstab nicht trivial sind und PCR-Nachweise wie oben beschrieben Schwächen aufweisen, erscheint ein serologischer Nachweis speziesspezifischer Antikörper gegen verschiedene Borrelienspezies zunächst am durchführbarsten. Ziel dieser weiteren Forschungen war es dementsprechend, einen LIA zur Differenzierung der Antikörper gegen fünf verschiedene Borrelienspezies aus caninen und equinen Serumproben zu entwickeln und zu validieren. In Zusammenarbeit mit der Firma VIROTECH Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Deutschland) wurde deshalb ein LIA entwickelt. Positive Ergebnisse könnten Rückschlüsse auf das Vorkommen und im Zusammenhang mit der Klinik gegebenenfalls auch die Pathogenität dieser Spezies in Bezug auf Hunde und Pferde erlauben.

1 Material und Methoden

1.1 Infektionsmechanismus

Insgesamt wurden 410 Serumproben mithilfe des neu entwickelten LIAs untersucht. Darunter waren zehn murine Seren, 200 canine Seren und 200 equine Seren. Diese Proben waren dem Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie der Tiermedizinischen Fakultät der LMU München zu diagnostischen Zwecken zugeschickt worden, da die Tiere klinische Anzeichen einer LB aufwiesen, oder stammten aus ehemaligen Versuchen. Alle Seren waren bei -80 °C gelagert und bereits zuvor mit dem am Lehrstuhl entwickelten KELA sowie dem *Borrelia*

Veterinär plus OspA LINE (VIROTECH Diagnostics GmbH, Rüsselsheim, Deutschland) getestet worden. Die Einteilung der Gruppen erfolgte basierend auf den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche (DOFF *et al.*, 2022). Zudem dienten die Seren von zehn Mäusen als Kontrolle, welche experimentell mit den Spezies *B. afzelii* PKo ($n = 2$), *Bbss* N40 ($n = 4$), *B. bavariensis* PBi ($n = 2$) und *B. spielmanii* A14S ($n = 2$) infiziert worden waren (KRUPKA *et al.*, 2009; KNAUER *et al.*, 2011).

1.2 Speziesdifferenzierung mithilfe des entwickelten LIA

Der LIA und die zugehörigen Reagenzien wurden in Zusammenarbeit mit der Firma VIROTECH Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Deutschland) zu rein experimentellen Zwecken entwickelt. Die Durchführung des Tests erfolgte entsprechend Bedienungsanleitung des Borrelia Veterinär plus OspA LINE der Firma VIROTECH Diagnostics GmbH. Lediglich die Einwirkungszeit des Substrates war mit 17 Minuten länger als beim Borrelia Veterinär plus OspA LINE. Für die murinen Seren wurde ein anti-mouse IgG (Gesamtmolekül, Alkalische Phosphatase, in Ziege hergestellte Ak) der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland; Katalognummer A9316) verwendet. Dieses Konjugat wurde vor dem Auftragen wie in der Bedienungsanleitung beschrieben im Verhältnis 1:30.000 mit Waschpuffer verdünnt. Die Evaluierung der entstandenen Streifen erfolgte visuell. Aufgrund der Stärke der Färbung der Ak-Linien auf den Streifen erfolgte eine Einteilung in negativ (-), schwach positiv (+), positiv (++) und stark positiv (+++). Die Auswertung erfolgte ohne eine Cut-Off-Kontrolle.

Jeder Teststreifen war mit 15 Proteinbanden besprüht worden. Diese bestanden aus jeweils einer Bande für die Serumkontrolle, das Protein VlsE und das Protein OspA. Die restlichen 12 Proteinbanden waren je sechs spezies-spezifische DbpA-Banden und sechs spezies-spezifische OspC-Banden. Die verwendeten Spezies waren *B. afzelii*, *Bbss* Z27, *Bbss* B31, *B. bavariensis*, *B. garinii* und *B. spielmanii*, welche in dieser Reihenfolge auf die Streifen aufgesprüht wurden.

2 Ergebnisse

2.1 Murine Serumproben

Alle murinen Proben reagierten mit deutlichem Farbumschlag an der VlsE-Bande (Abbildung 6A). Keines der Mäuseseren zeigte eine Reaktion mit der OspA-Proteinbande (Abbildung 6A). Die Reaktionen der murinen Proben bezüglich der OspC-Banden waren für die einzelnen Borrelienspezies nicht spezifisch, hier konnten bei jedem Serum Kreuzreaktionen verzeichnet werden (Abbildung 6). Konsequenterweise werden im Folgenden ausschließlich die Reaktionen mit der DbpA-Proteinbande dargestellt.

Die Mäuseseren der Tiere, die mit *Bbss* infiziert worden waren, reagierten nur für diese Spezies stark; die farbliche Reaktion der *Bbss*-Banden auf der Nitrozellulosemembran war deutlich (Abbildung 6B). Die Seren der experimentell mit *B. bavariensis* infizierten Mäuse ($n = 2$) reagierten für diese Spezies; der Farbumschlag auf der Nitrozellulosemembran war deutlich sichtbar. Eines dieser beiden Mäuseseren reagierte auch leicht für *Bbss* (Abbildung 6C). Die Serumproben der Mäuse, die experimentell mit *B. afzelii* infiziert worden waren ($n = 2$), zeigten keine sichtbaren Reaktionen mit der DbpA-Proteinbande, jedoch diverse Reaktionen gegen OspC-Antigene verschiedener Borrelienspezies (Abbildung 6D). Eines der Seren der beiden mit *B. spielmanii* infizierten Mäuse zeigte eine Reaktion in Form eines Farbwechsels auf der Nitrozellulosemembran nur für diese Borrelienspezies. Das zweite Mäuseserum reagierte mit keiner Spezies; es waren keine Verfärbungen von Proteinbanden sichtbar (Abbildung 6E).

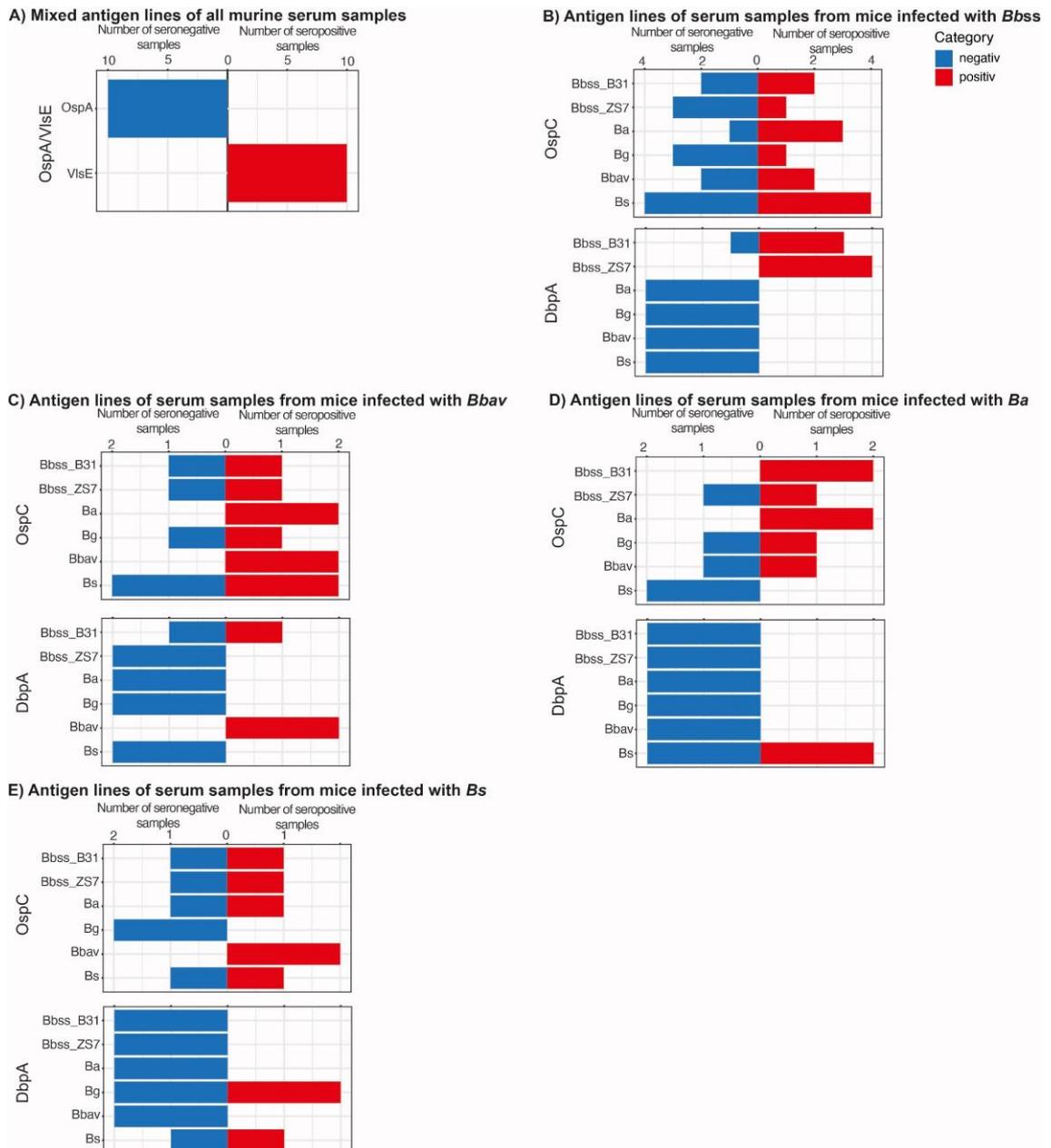


Abbildung 6: Auswertung der murinen Seren im Spezies-LIA

Zu sehen sind A) Seren aller mit Borrelienspezies infizierten Mäuse; B) Seren der mit *Bbss*-infizierten Mäuse; C) Seren der mit *B. bavariensis* infizierten Mäuse; D) Seren der mit *B. afzelii* infizierten Mäuse; E) Seren der mit *B. spielmanii* infizierten Mäuse. Gezeigt werden hier jeweils die Anzahl der Tiere (blau) und die Bildung von Ag-Ak-Komplexen mit der entsprechenden Borrelienspezies (rot) mit den Proteinen DbpA und OspC und mit den speziesunabhängigen Proteinen VlsE und OspA.

Ba: *Borrelia (B.) afzelii*; *Bbss*: *B. burgdorferi* sensu lato; *Bbav*: *B. bavariensis*; *Bg*: *B. garinii*; *Bs*: *B. spielmanii*; VlsE, variable major protein-like sequence, expressed; OspA, outer surface protein A; DbpA: decorin binding protein A; OspC: outer surface protein C

2.2 Canine Seren

Kontrollgruppe der Cornell University

Bis auf zwei Proben reagierten alle Seren wie zu erwarten an den VlsE- und OspA-Banden (Abbildung 7A). Die Proben der seronegativen SPF-Hunde zeigten keine Reaktion mit den speziesspezifischen Ag-Banden auf der Nitrozellulosemembran (Abbildung 7B). Die Proben der seropositiven SPF-Hunde aus der Kontrollgruppe der Cornell University ($n = 13$) zeigten Ag-Ak-Reaktionen ausschließlich mit *Bbss* (Abbildung 7C). Zwei der positiven Proben wiesen keine Reaktion mit Ag-Banden auf. Vier Seren der geimpften Hunde der Cornell University ($n = 19$) reagierten mit *B.-afzelii*-Proteinbanden (Abbildung 7D).

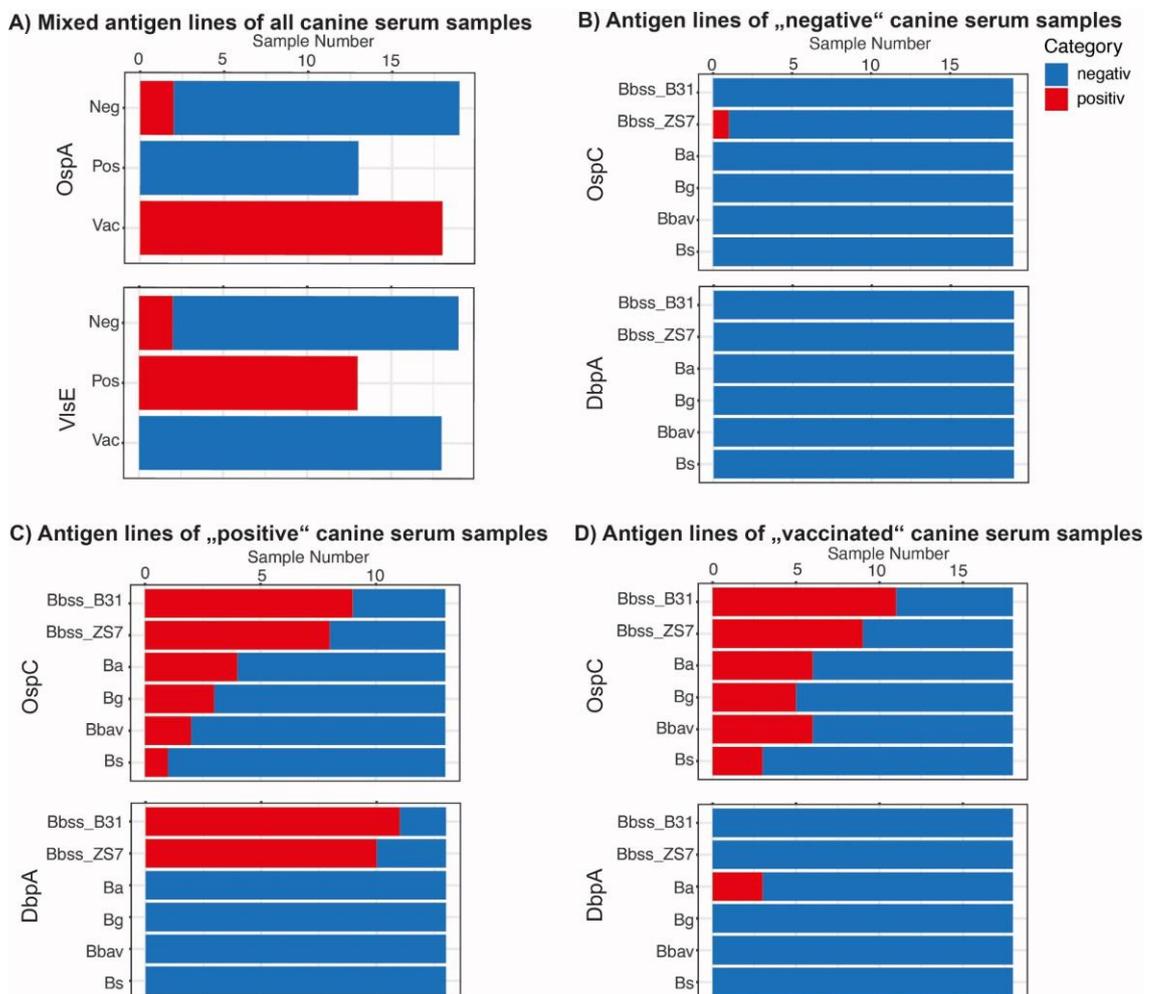


Abbildung 7: Auswertung der caninen Kontrollseren der Cornell University im Spezies-LIA

Zu sehen sind A) Reaktionen aller caninen Seren der Cornell University für die Proteine OspA und VlsE; B) Reaktionen der negativen caninen Seren der Cornell University für die Proteinbanden von DbpA und OspC; C) Reaktionen der positiven caninen Seren der Cornell University für die Proteinbanden von DbpA und OspC; D) Reaktionen der geimpften caninen Seren der Cornell

University für die Proteinbanden von DbpA und OspC. Gezeigt werden hier jeweils die Anzahl der Tiere (blau) und die Bildung von Ag-Ak-Komplexen mit der entsprechenden Borrelienspezies (rot) mit den Proteinen DbpA und OspC und mit den speziesunabhängigen Proteinen VlsE und OspA.

Ba: Borrelia (B.) afzelii; Bbss: B. burgdorferi sensu lato; Bbav: B. bavariensis; Bg: B. garinii; Bs: B. spielmanii; VlsE, variable major protein-like sequence, expressed; OspA, outer surface protein A; DbpA: decorin binding protein A; OspC: outer surface protein C

Canine Feldseren

Die Gruppe der 150 caninen Feldseren bestand aus 48 negativen, 51 geimpften und 51 positiven Proben. Fast alle Proben reagierten wie zu erwarten mit den VlsE- und OspA-Proteinbanden (Abbildung 8A). Drei Proben aus der Gruppe der seronegativen Hunde ($n = 48$) reagierten mit der *Bbss*-Ag-Bande (Abbildung 8B). Beim im Institut routinemäßig genutzten KELA sowie dem regulären LIA entstanden bei diesen drei Hundeseren jedoch negative Ergebnisse. Die übrigen Proben aus dieser Gruppe der negativen caninen Seren zeigten keine Reaktion in Form einer Verfärbung der Nitrozellulosemembran im entwickelten Spezies-LIA.

Insgesamt 45,1 % ($n = 23$) der Seren aus der Gruppe der seropositiven Hunde ($n = 51$) reagierten mit Ag von nur einer Borrelienspezies. Die Spezies, mit der die meisten Ag-Ak-Reaktionen auftraten, war *Bbss* ($n = 18$; 35,3 %), gefolgt von *B. bavariensis* ($n = 4$; 7,8 %) und *B. garinii* ($n = 1$; 2,0 %) (Abbildung 8B). Insgesamt wiesen 43,1 % der Proben von seropositiven Hunden Mischinfektionen mit zwei (31,4 %) oder mehr Borrelienspezies auf (11,8 %). Die Kombination von *Bbss* und *B. afzelii* trat am häufigsten auf (17,6 %). Sechs der positiven Hundeseren (11,8 %) reagierten mit keiner der speziespezifischen Ag-Banden (Abbildung 8B). Kein Serum dieser Gruppe reagierte mit *B. spielmanii*. Bei den Seren aus der Gruppe der geimpften Hunde ($n = 51$) reagierten 45,1 % ($n = 23$) mit *B. afzelii*, 3,9 % ($n = 2$) mit *Bbss*, 2,0 % ($n = 1$) mit *B. garinii* und 2,0 % ($n = 1$) mit *B. bavariensis*. Auch hier konnte bei keinem Serum eine Ag-Ak-Bildung mit *B. spielmanii* verzeichnet werden (Abbildung 8D).

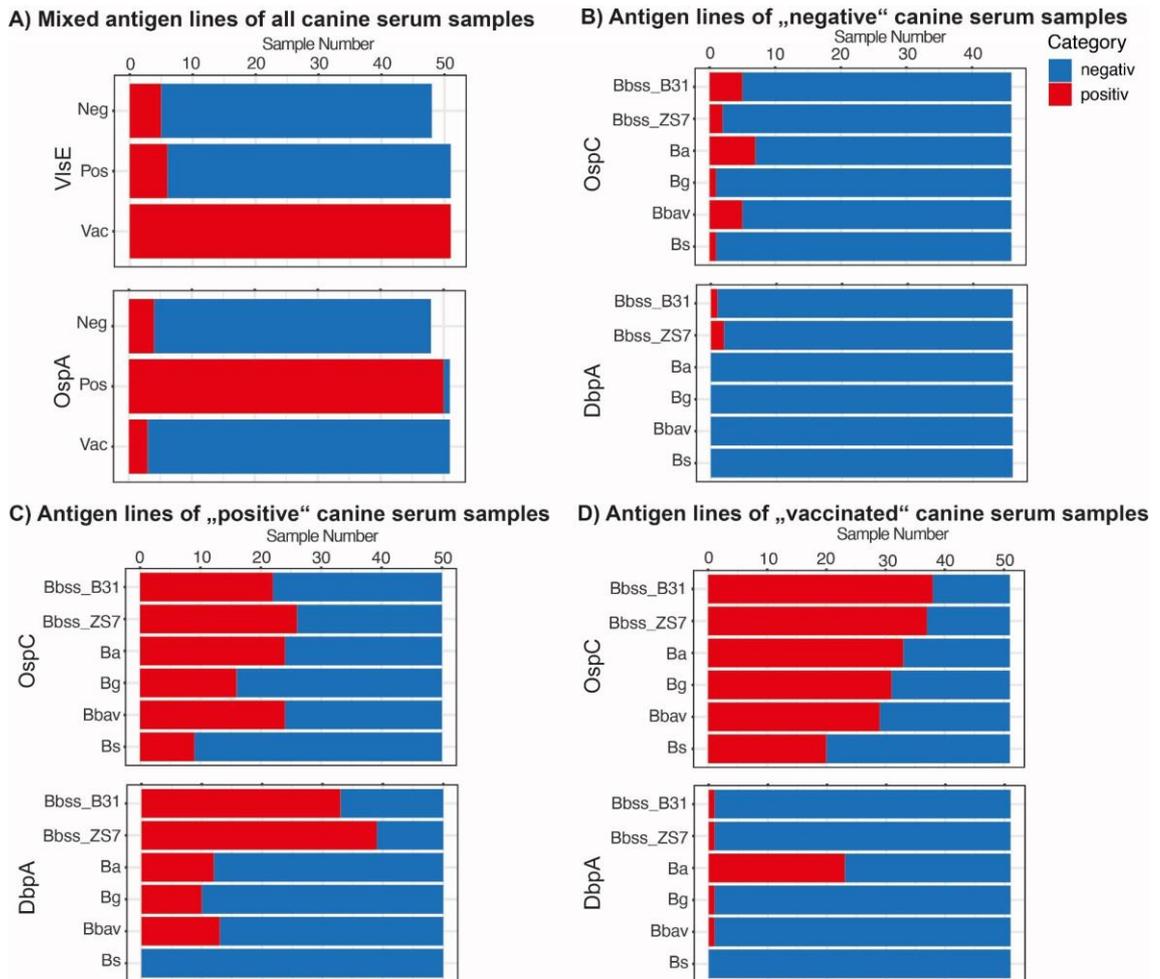


Abbildung 8: Auswertung der caninen Feldseren im Spezies-LIA

Zu sehen sind A) Reaktionen aller caninen Feldproben für die Proteine OspA und VlsE; B) Reaktionen der negativen caninen Feldproben für die Proteinbanden von DbpA und OspC; C) Reaktionen der positiven caninen Feldproben für die Proteinbanden von DbpA und OspC; D) Reaktionen der geimpften caninen Feldproben für die Proteinbanden von DbpA und OspC. Gezeigt werden hier jeweils die Anzahl der Tiere (blau) und die Bildung von Ag-Ak-Komplexen mit der entsprechenden Borrelienspezies (rot) mit den Proteinen DbpA und OspC und mit den speziesunabhängigen Proteinen VlsE und OspA.

Ba: Borrelia (B.) afzelii; Bbss: B. burgdorferi sensu lato; Bbav: B. bavariensis; Bg: B. garinii; Bs: B. spielmanii; VlsE, variable major protein-like sequence, expressed; OspA, outer surface protein A; DbpA: decorin binding protein A; OspC: outer surface protein C

2.3 Equine Seren

Die Gruppe der 200 equinen Seren bestand aus 59 negativen Proben, 52 geimpften Proben, 35 positiven Seren und 54 grenzwertigen Tieren. In allen Gruppen, vor allem aber bei den geimpften Pferden, konnten deutliche Reaktionen in Form eines

Farbumschlags auf der Nitrozellulosemembran mit OspA beobachtet werden (Abbildung 9A). Auch mit der VlsE-Bande reagierten Proben aus allen Gruppen, am häufigsten konnte die Bildung von Ag-Ak-Komplexen bei den grenzwertigen Seren beobachtet werden (Abbildung 9A). Aus der Gruppe der seronegativen Tiere ($n = 59$) reagierten vier Pferdeseren mit Ag der Spezies *B. garinii*, drei mit *Bbss*, zwei mit *B. bavariensis* und eines mit *B. spielmanii*. Bei den übrigen Seren dieser Gruppe konnte keine Reaktion verzeichnet werden (Abbildung 9B).

In der Gruppe der seropositiven Pferdeproben ($n = 35$) wiesen 48,6 % ($n = 17$) Ak für nur eine Borrelienspezies auf. Am häufigsten konnten Reaktionen mit *B. garinii* beobachtet werden ($n = 9$; 25,7 %), gefolgt von *B. bavariensis* ($n = 5$; 14,3 %) und *Bbss* ($n = 3$; 8,6 %; Abbildung 9C). Die übrigen positiven Pferdeseren reagierten auf Ag von zwei (17,1 %) oder mehr (28,6 %) Borrelienspezies oder zeigten keine Reaktion (5,7 %). Die Kombination von Ag-Ak-Reaktionen gegen *B. garinii* und *Bbss* traten am häufigsten auf ($n = 4$; 11,4 %).

In der Gruppe der geimpften Pferde ($n = 52$) reagierte die Mehrheit der Seren für *B. afzelii* ($n = 42$). Sechs Tiere zeigten Reaktionen für *Bbss* und zwei für *B. bavariensis*. Keines der Seren reagierte auf Ag von *B. garinii* oder *B. spielmanii* (Abbildung 9D).

In der Gruppe der als grenzwertig diagnostizierten Pferde ($n = 54$) reagierten 40,7 % ($n = 22$) der Proben mit Ag einer einzigen Borrelienspezies. Vierzehn Tiere reagierten mit Ag von *Bbss*, sieben Tiere bildeten sichtbare Ag-Ak-Komplexe an der Proteinbande von *B. garinii* und ein equines Serum reagierte mit *B. bavariensis* (Abbildung 9E). Fünf Seren wiesen eine Mischinfektion mit zwei Spezies der Spirochäten auf, wobei die Kombination von *Bbss* und *B. bavariensis* viermal auftrat und ein Tier eine Infektion mit *Bbss* und *B. garinii* aufwies.

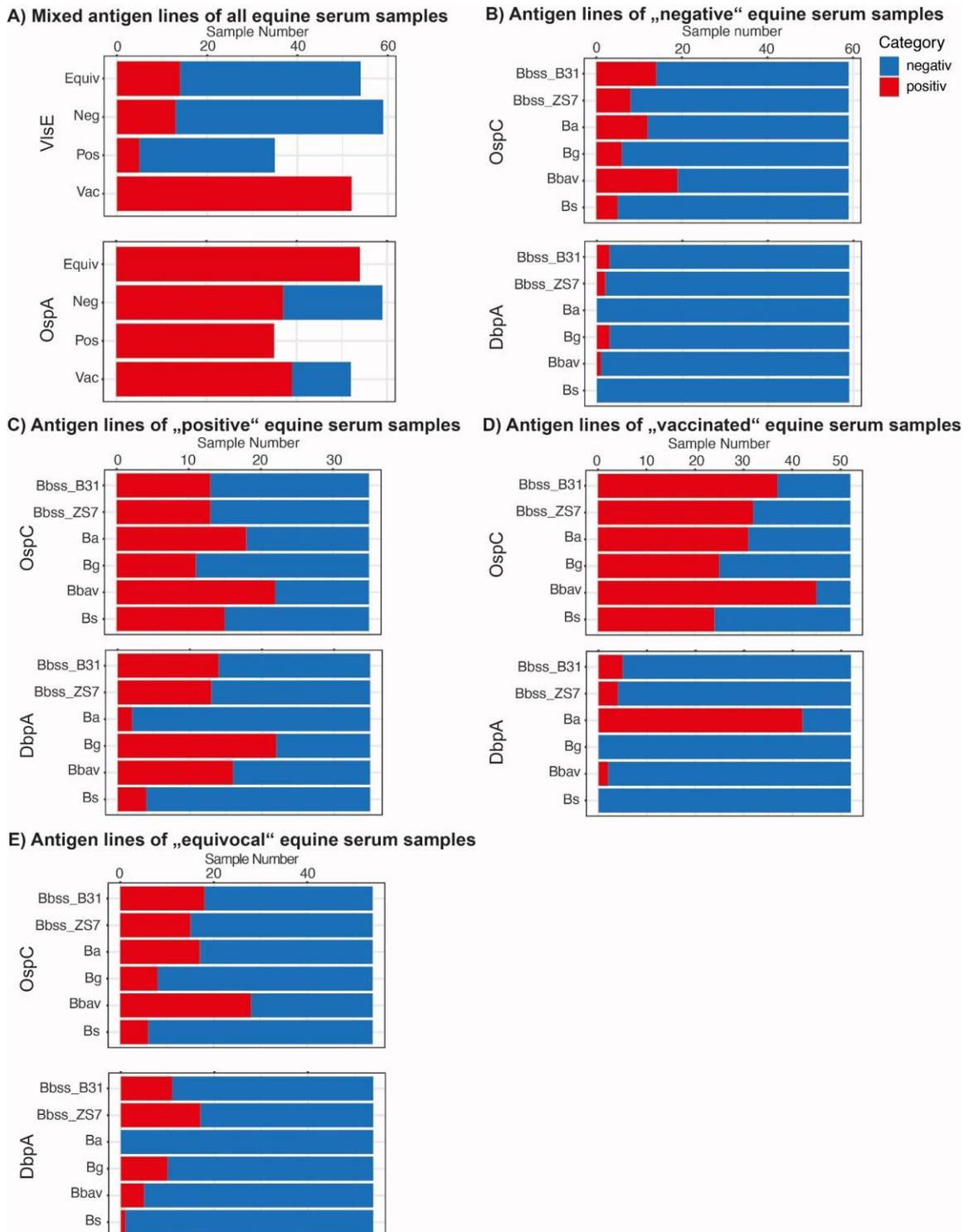


Abbildung 9: Auswertung der equinen Seren im Spezies-LIA

Zu sehen sind A) Reaktionen aller equinen Seren für die Proteine OspA und VlsE; B) Reaktionen der negativen equinen Seren für die Proteinbanden von DbpA und OspC; C) Reaktionen der positiven equinen Seren für die Proteinbanden von DbpA und OspC; D) Reaktionen der Seren geimpfter Pferde für die Proteinbanden von DbpA und OspC; E) Reaktionen der grenzwertigen equinen Seren für die Proteinbanden von DbpA und OspC. Gezeigt werden hier jeweils die Anzahl der Tiere (blau) und die Bildung von Ag-Ak-Komplexen mit der entsprechenden Borrelienspezies (rot) mit den Proteinen DbpA und OspC und mit den speziesunabhängigen Proteinen VlsE und

OspA.

Ba: Borrelia (B.) afzelii; Bbss: B. burgdorferi sensu lato; Bbav: B. bavariensis; Bg: B. garinii; Bs: B. spielmanii; VlsE, variable major protein-like sequence, expressed; OspA, outer surface protein A; DbpA: decorin binding protein A; OspC: outer surface protein C

3 Diskussion der Ergebnisse der weiteren Forschungen

In der Humanmedizin existieren einige Testverfahren, um Erreger des *Bbsl*-Komplexes zu differenzieren. Hierzu zählen beispielsweise die DNA-DNA-Hybridisierung (WAYNE *et al.*, 1987; RICHTER *et al.*, 2006), die Multi-Locus Sequenzanalyse (MLSA) (RICHTER *et al.*, 2006; RUDENKO *et al.*, 2009a; MARGOS *et al.*, 2010), der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) (MASUZAWA *et al.*, 1996a; WANG *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2001), Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE) (BUSCH *et al.*, 1996) oder die Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens (WILSKE *et al.*, 1993a). Diese direkten Nachweisverfahren basieren auf dem Prinzip der PCR mit anschließender Gensequenzanalyse und liefern die besten Resultate mit Proben aus Hautgewebe (WIENECKE *et al.*, 1993; BRETTSCHEIDER *et al.*, 1998; WANG, 2002; AGUERO-ROSENFELD *et al.*, 2005). Auch aus Urin- und Blutproben kann sehr selten und ausnahmsweise der Nachweis von Borrelien-DNA gelingen; aufgrund der häufig falsch-negativen Ergebnisse haben diese sich in der Diagnostik jedoch sowohl bei caninen als auch humanen Proben als nicht geeignet erwiesen (BRETTSCHEIDER *et al.*, 1998; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; LITTMAN *et al.*, 2006; LESCHNIK *et al.*, 2010). Bisher fungierten Testverfahren zum Nachweis verschiedener Borrelienspezies auch beim Tier fast ausschließlich auf Methoden der PCR mit anschließender DNA-Analyse (MÜLLER *et al.*, 2002; WODECKA *et al.*, 2009; SKOTARCZAK, 2014; ALHO *et al.*, 2016). Für größere und insbesondere respektive Untersuchungen eignen sich PCR-Verfahren jedoch nicht. Zum einen ist wie oben beschrieben eine akzeptable Sensitivität insbesondere bei Blut- und Urinproben nicht vorhanden und das Verfahren funktioniert am verlässlichsten mit Hautbiopsien an der Einstichstelle der Zecke. Die exakte Benennung der Einstichstelle kann hierbei eine weitere Herausforderung darstellen. Zum anderen ist die Akzeptanz der Besitzer hinsichtlich der Entnahme von Gewebeproben nicht hoch und dies würde je nach Tierart sogar eine Narkose, Sedation und gegebenenfalls Antibiose erfordern. Folglich wurde eine Untersuchung von Antikörpern in bereits vorhandenen Proben

vorgezogen.

Im Zuge der Zusammenarbeit mit VIROTECH Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Deutschland) wurde ein LIA zur Speziesdifferenzierung von Erregern des *Bbsl*-Komplexes in equinen und caninen Seren entwickelt. Hierbei lag das Ziel in einer durchführerfreundlichen, nicht-invasiven, sicheren Differenzierung von in Deutschland und Europa vorkommenden pathogenen Borrelienspezies und damit einhergehenden Erkenntnissen über mögliche auslösende Spezies equiner und caniner LB. Aufgrund ihrer europaweit beschriebenen Humanpathogenität und ihres häufigen Vorkommens in *Ixodes-ricinus*-Zecken wurden zur Entwicklung des LIAs die fünf Spezies *Bbss*, *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii* und *B. spielmanii* ausgewählt (WILSKE *et al.*, 1985; HERZBERGER *et al.*, 2007; MARGOS *et al.*, 2013; STRNAD *et al.*, 2017; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2018; SPRINGER *et al.*, 2020). Hierfür wurden Ag der Oberflächenproteine OspC und DbpA auf die Nitrozellulosemembran aufgesprüht. Diese beiden plasmidkodierte Lipoproteine sind hochspezifische Marker für eine Borrelieninfektion und ermöglichen aufgrund ihrer genetischen Unterschiede eine Speziesdifferenzierung (PADULA *et al.*, 1994; ROBERTS *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2002; SCHULTE-SPECHTEL *et al.*, 2003; BRADSHAW *et al.*, 2017).

Bei der Evaluierung der Spezies-LIA ist zu berücksichtigen, dass keine cut-off-Kontrolle verwendet wurde. Hierdurch können falsch-positive Ergebnisse aufgrund von Kreuzreaktionen oder Missinterpretationen des Farbumschlags der Proteinbanden entstehen. Zudem kann die OspC-Bande grundsätzlich für alle Borrelienspezies nicht in die Auswertung mit einbezogen werden, da diese mit den Seren der Kontrollgruppen der Mäuse und SPF-Hunde der Cornell University unspezifisch reagiert hatte. Auch eine speziesspezifische Reaktion der DbpA-Bande konnte nicht durch die Kontrollseren verifiziert werden. Insbesondere reagierten Ak gegen die Spezies *B. afzelii*, *B. bavariensis* und *B. spielmanii* in murinen Seren nicht spezifisch, während Antikörper gegen *Bbss* in caninen Seren eine höhere, aber nicht vollständige Sensitivität zeigten. Des Weiteren standen keine Seren von Mäusen, die mit *B. garinii* infiziert worden waren, zur Verfügung. Für diese Spezies gibt es somit keinen Nachweis über die Korrektheit der Ergebnisse. Ein möglicher Grund für die Resultate könnte eine mangelnde Spezifität oder Sensitivität der auf die Nitrozellulosemembran aufgesprühten Ag sein. Zudem ist die Infektion von Mäusen mit verschiedenen Spezies des *Bbsl*-

Komplexes zwar möglich, die Anzahl von gebildeten Ak variiert jedoch bei den einzelnen Spezies der Spirochäten, wie aus Krupkas Versuch deutlich wird (KRUPKA *et al.*, 2009). Die Kontrollgruppe der seropositiven SPF-Hunde, welche mit *Bbss* N40 infiziert worden waren, reagierte lediglich für diese Spezies (STRAUBINGER *et al.*, 1998a). Allerdings konnte für zwei der dreizehn caninen Seren keinerlei Ag-Ak-Reaktion auf der Nitrozellulosemembran verzeichnet werden. Möglich wäre es demnach, dass nicht alle Tiere dieser Studie mit einer *Bbss*-Infektion erfasst worden sind.

Während das Vorgehen hinsichtlich der Entwicklung eines serologischen Tests zum Nachweis verschiedener Borrelienspezies in diesem Test als durchaus erfolgsversprechend eingestuft werden kann, bedarf der LIA noch Entwicklungsarbeit insbesondere hinsichtlich der erforderlichen Menge und Spezifität der aufgetragenen Antikörper. Optimalerweise wären für eine erneute Testung Seren von SPF-Hunden und -Pferden, die mit den entsprechenden Spezies des *Bbsl*-Komplexes infiziert wurden, vorhanden. Dies ist jedoch aufgrund des mit einem erforderlichen Tierversuch verbundenen Aufwands und dem Mangel an SPF-Pferden kaum möglich. Gegebenenfalls ließe sich dies über die Herstellung synthetischer Antikörper umgehen. Eine Weiterführung der hier begonnenen Etablierung eines speziesspezifischen Borrelien-LIAs war im Rahmen der vorgestellten Arbeit leider nicht mehr möglich, sollte aber in Zukunft fortgesetzt und abgeschlossen werden.

V. DISKUSSION

Weltweit ist LB eine der wichtigsten humanpathogenen, durch Zecken übertragenen Erkrankungen. Auch eine canine Form der klinischen LB konnte anhand mehrerer Tierversuche belegt werden (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1998a; CHANG *et al.*, 2001; KORSHUS *et al.*, 2004; BAUM *et al.*, 2014). Als diagnostisches Mittel der Wahl konnte sich ein Zweistufentest etablieren, welcher als ersten Schritt einen KELA vorsieht, um eine kostengünstige Vorselektion über negative Seren zu treffen. Ein LIA als zweiter Test verifiziert die positiven Ergebnisse des KELA und kann zwischen Infektion und Impfung unterscheiden (BARTH *et al.*, 2014).

Beim Pferd hingegen ist die Existenz einer klinischen LB umstritten; in Fachkreisen wird von einer Überdiagnose ausgegangen (GALL & PFISTER, 2006; BARTOL, 2013; HOUBEN *et al.*, 2020). Im Gegensatz zum Hund konnten bei experimentellen Infektionen equiner Versuchstiere keine klinischen Anzeichen hervorgerufen werden (BURGESS & GENDRON-FITZPATRICK, 1990; CHANG *et al.*, 2000a). Häufig unvollständige Anamnesen und unklare Krankheitsverläufe erschweren die Diagnosestellung. Zudem wird beim Pferd die Zweistufendiagnostik zwar empfohlen, allerdings erwiesen sich ELISAs hierbei als weitaus weniger aussagekräftig als beim Hund (FRITZ, 2018; HOUBEN *et al.*, 2020).

Durch das stetige Voranschreiten der Wissenschaft sowie aufgrund neuer Erkenntnisse und Möglichkeiten der Diagnostik ist es von großer Bedeutung, bestehende Testmethoden immer wieder zu überdenken und zu optimieren. Da LB unter Umständen eine schmerzhaftes Erkrankung ist, die die Lebensqualität betroffener Tiere und Patientenbesitzer stark einschränken kann, ist eine richtige Diagnosestellung äußerst dringlich. Doch auch falsch-positive Testergebnisse und daraus resultierende unnötige Gaben von Antibiotika gilt es unbedingt zu vermeiden. Das Ziel dieser Studie war es deshalb, die Diagnoseverfahren der caninen und equinen LB zu überprüfen. Hierfür wurden Seren von Hunden und Pferden mit bekanntem Borrelien-Ak-Status mithilfe zweier kommerziell erhältlicher LIAs untersucht. Die Tests wurden in Bezug auf Sensitivität, Spezifität und den Resultaten verglichen. Auch Handhabung und Auswertungsverfahren der Tests wurden gegenübergestellt, um die Vor- und Nachteile des jeweiligen LIAs hervorzuheben.

1 Sensitivität, Spezifität und Ergebnisse der LIAs zur Diagnostik einer Borrelien-Infektion

Durch den Klimawandel werden die Überlebensbedingungen für Zecken immer günstiger: wärmere Winter mit weniger Schnee und Frost ziehen eine erhöhte Zeckenpopulation nach sich, wodurch auch die Infektionsrate bei Haustieren steigen wird (LINDGREN *et al.*, 2006). Hunde leben für gewöhnlich mit ihren Besitzern im Haus und haben sehr engen Körperkontakt zu diesen. Sind die Tiere nicht gegen Borrelien geimpft oder anderweitig durch Repellentien vor Zecken geschützt, können sie leicht zu Trägern einer Borrelien-Infektion werden. Wenn an diesen infizierten Hunden wiederum eine Nymphe ihre Blutmahlzeit zu sich nimmt, führt das zu immer mehr infizierten Zecken in häuslichen Regionen. Diese infizierten Vektoren verbreiten dann in Gärten und Parks weiter Borrelien an Haustiere oder Menschen, die sich dort aufhalten. Aufgrund dieser potenziellen indirekten Übertragung der Borrelien auf den Menschen ist es wichtig, eine sichere Diagnose zu stellen (DAY, 2011). Sollte diese die Infektion bestätigen, kann das Tier entsprechend mit Antibiotika therapiert werden und eine Weiterverbreitung der Borrelien wird unterbunden. Da die mit der Therapie verabreichten Medikamente auch Nebenwirkungen und die Gefahr einer Resistenzbildung gegen Antibiotika mit sich ziehen, müssen falsch-positive Ergebnisse in den Untersuchungsmethoden unbedingt vermieden werden.

Mit einer Übereinstimmung von 94 % sind beide innerhalb dieser Studie getesteten LIAs zur Diagnostik von caninen Seren geeignet. Die höchste Übereinstimmung ($\kappa^2 = 0,895$) konnte hierbei für die Gruppe der Kontrollseren der Cornell University verzeichnet werden. Den zweithöchsten Index für Kappa ($\kappa^2 = 0,882$) hatte die Gruppe der positiven Hunde ($n = 50$). Im LIA A wurden hier 47, im LIA B 45 Tiere als mit Borrelien infiziert diagnostiziert. Mögliche Gründe, warum ursprünglich mehr Caniden als seropositiv bewertet und deshalb in diese Gruppe eingeteilt worden waren, könnten falsche Handhabung, Fehler in der Probenevaluierung oder der Durchführung des früheren Tests oder ein fehlerhafter Test selbst sein. In der Gruppe der negativen Feldseren ($n = 50$) wurden in LIA A 47 Seren als negativ diagnostiziert, bei LIA B 48 Proben. Zwei Tiere bildeten in beiden Tests Ag-Ak-Komplexe, die auf eine Infektion schließen lassen. Einer dieser Hunde hatte einen KELA-Wert von 256,6 KELA-Einheiten, die anderen beiden caninen Seren hatten Werte von 138,9 bzw. 151,7 Units. Generell kann in der Diagnostik der Borrelien-

Infektion bei Hunden ab einem Wert von 100 KELA-Units von einer Infektion ausgegangen werden, welche dann mithilfe des LIAs verifiziert wird (CHANG *et al.*, 1995; JACOBSON *et al.*, 1996). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass bei zumindest zwei dieser Proben, bei denen die Ergebnisse in LIA A und LIA B übereinstimmen, beim vorhergegangenen Testen Fehler unterlaufen sind.

Für die Gruppen der negativen und geimpften Tiere sowie die Kontrollseren der Cornell University konnten stärkere Farbreaktionen der VlsE-Bande bei LIA B im Vergleich zu LIA A beobachtet werden. Die für LIA A spezifische C₆-Bande reagierte für eben genannte Gruppen deutlich. Die VlsE-Banden beider LIAs, sowie die C₆-Bande des LIA A bildeten Ag-Ak-Komplexe mit den Seren der positiven Hunde, was mit deutlichen farblichen Reaktionen der jeweiligen Proteinbanden einherging. Das Protein C₆ ist ein Peptid der IR6 des VlsE und ruft beim Hund ausgeprägte Immunogenität hervor (LIANG & PHILIPP, 1999; LIANG *et al.*, 2000); in der Diagnostik wird vor allem bei kommerziellen ELISA-Schnelltests Gebrauch von diesem Protein gemacht (LEVY, 2002). In dieser Studie reagierten acht von 200 caninen Seren mit der C₆-Bande, jedoch nicht mit der VlsE-Bande des LIA A. Dies entspricht 4 % aller getesteten Hunde. Zudem hatten drei der eben genannten Hundeseren im LIA B Ergebnisse, die sich von denen im LIA A unterschieden. So wurde ein Hund (RKS-B-8324-C) von LIA A als geimpft und infiziert, von LIA B nur als infiziert diagnostiziert. In der Anamnese wurde zum damaligen Zeitpunkt der Probenentnahme kein Vermerk beigefügt, dass dieses Tier geimpft worden sei. Die zweite Probe mit unterschiedlichem Ergebnis aufgrund der C₆-Bande ist das Tier RKS-B-7996-C. Dieser Hund wurde von LIA A als Borrelien-positiv, im LIA B als grenzwertig befundet. Der KELA-Wert dieses Tieres lag bei 103,7 Units und somit gerade über der Grenze von 100 Units. Hier könnte eine frühe Infektion vorliegen, bei der die Ag des LIA A mehr Ak gebunden haben als die des LIA B. In der Praxis würde man bei diesem Tier die Empfehlung aussprechen, nach 1 bis 2 Wochen nochmals eine Blutprobe zu nehmen, um die Verdachtsdiagnose einer Borrelien-Infektion mit einem angestiegenen Ak-Titer und demnach deutlich positivem Test zu bestätigen. Der letzte Hund, bei dem aufgrund der positiven C₆-Bande ein anderes Ergebnis in LIA A als in LIA B entstand, ist das Tier S98-5/4 aus der Kontrollgruppe der Hunde der Cornell University. Da dies ein SPF-Hund war, der im Vergleich zu anderen Tieren aus diesem Versuch nicht mit Borrelien infiziert worden war (STRAUBINGER *et al.*,

1998a), ist das Reagieren der C₆-Bande hier als falsch anzusehen. Zieht man diese Ergebnisse in Betracht, ist eine Trennung von den Banden C₆ und VlsE nicht von diagnostischem Vorteil. Dies widerspricht einer Studie von Breu und Müller (BREU & MÜLLER, 2017), in welcher die Ergebnisse der VlsE- und C₆-Bande bei mehr als 26 % der Proben divergierten, sodass die Notwendigkeit einer Separation der Proteinbanden gesehen wurde.

Die equine LB wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert, vor allem da bei Versuchen mit SPF-Ponys, die mit *Bbss* infiziert worden waren, die Tiere trotz steigender Ak gegen Borrelien keinerlei klinische Anzeichen entwickelten (CHANG *et al.*, 2000a). Nichtsdestotrotz sind die im Feld beschriebenen klinischen Manifestationen der LB bei Pferden, sowie beim Menschen und beim Hund, breit gefächert. Zusätzlich zu unspezifischen klinischen Manifestationen wie Fieber, Apathie und Lethargie werden weltweit Fälle von Lahmheit (BROWNING *et al.*, 1993), neurologischen Erscheinungen (JAMES *et al.*, 2010), Uveitis (PRIEST *et al.*, 2012) sowie kutanem Pseudolymphom (SEARS *et al.*, 2012), ausgelöst durch Erreger des *Bbsl*-Komplexes, beschrieben. Multiple Studien aus diversen Ländern belegen die Infektion von Pferden mit Borrelien anhand serologischer Untersuchungen (KÄSBOHRER & SCHÖNBERG, 1990; BHADE *et al.*, 2008; DURRANI & GOYAL, 2011; BAE, 2018; GEHLEN *et al.*, 2023). Hinsichtlich der Weiterverbreitung der Spirochäten vor allem in Bezug auf Infektionen des Menschen spielen Pferde jedoch eine geringere Rolle als Hunde, da sie für gewöhnlich nicht auf so engem Raum mit ihren Haltern zusammenwohnen. Um eine tatsächliche equine LB diagnostizieren zu können, spielen bei Pferden zusätzlich zu einem positiven AK-Titer noch weitere Anhaltspunkte eine wichtige Rolle. So sollten vor der antibiotischen Behandlung alle weiteren Krankheiten, die die klinischen Anzeichen verursachen könnten, ausgeschlossen werden. Auch sollte berücksichtigt werden, ob das Pferd in einem Endemiegebiet gehalten wird und eine Zeckenexposition gegeben war (DIVERS, 2013; DIVERS *et al.*, 2018).

Die zwei untersuchten LIAs hatten bei den equinen Proben eine Übereinstimmung der Ergebnisse von 65,5 %. Wie zuvor bei den Hundeseren, konnte auch bei den Pferden die höchste Kongruenz ($\kappa^2 = 0,519$) bei der Kontrollgruppe der geimpften Tiere verzeichnet werden. Hier wurden im LIA A 47 und im LIA B 48 equine Proben richtigerweise als geimpft diagnostiziert. Die Gruppe der als negativ diagnostizierten Tiere hatte beim Vergleich der Resultate der LIAs die zweithöchste

Übereinstimmung ($\kappa^2 = 0,457$). Im LIA B wurden 47 und im LIA A 38 Pferde als seronegativ bestimmt. Größere Diskrepanzen gab es bei den zuvor als positiv bewerteten Feldseren von Pferden. Während ursprünglich alle 50 Seren als positiv gewertet wurden, können in LIA A und LIA B zum jetzigen Zeitpunkt in dieser Gruppe maximal jeweils 29 und 17 Seren als positiv befundet werden. Für die Initialdiagnose wurde der LIA „Borrelia Veterinär plus OspA LINE“ (Virotech GmbH, Rüsselsheim), bzw. dessen Vorgängermodell verwendet. Eben genannter Vorläufer des „Borrelia Veterinär plus OspA LINE“ wurde von 2006 bis 2011 zur LB-Diagnostik der Proben verwendet und besaß 16 Ag; das heutige Modell dieses Tests besitzt nur noch sieben. Eine mögliche Erklärung, warum damals so viele Pferde mehr als positiv diagnostiziert worden waren, könnten Ag-Ak-Reaktionen auf den neun Proteinbanden sein, die der heutige LIA nicht mehr besitzt. Für einige dieser Proteine wie z. B. das p41 konnten Kreuzreaktionen mit bspw. RF-Borrelien nachgewiesen werden, was die Eignung dieser Proteinbanden zu diagnostischen Zwecken beeinträchtigt (WILSKE *et al.*, 1990; BRUCKBAUER *et al.*, 1992; SHIN *et al.*, 1993). Zudem ist eine falsche Interpretation der Teststreifen durch den Evaluierenden bei LIA B sowie dem „Borrelia Veterinär plus OspA LINE“ und dessen Vorgängermodell nicht auszuschließen. Der Scanner des LIA A kann eben solche unterschiedlichen Interpretationen durch verschiedene Untersucher umgehen und liefert standardisierte, objektive Ergebnisse. Die höchsten Diskrepanzen wies die Gruppe der grenzwertigen equinen Proben auf. Hier wurden im LIA A 25 Pferde als Borrelien-positiv diagnostiziert, im LIA B nur sechs Tiere. Zusammenfassend wurden von 200 equinen Proben im LIA A 40,7 % der Tiere als seropositiv bewertet, im LIA B waren es lediglich 23,3 %. Diese hohe Anzahl falsch-positiver Tiere verdeutlicht die dringende Notwendigkeit der Standardisierung der LB-Diagnostik bei Pferden, um den Tieren eine unnötige Langzeit-Antibiotikagabe zu ersparen. Neben einer eindeutigen Kontraindikation der unnötigen Antibiotikagabe im Hinblick auf die Resistenzbildung werden Antibiotika, die gegen Borrelien wirksam und in Deutschland für Equiden zugelassen sind, mit Ausnahme von Tetracyclinen nur intravenös oder intramuskulär verabreicht (DIVERS *et al.*, 2018). Hierdurch wird das Risiko einer Thrombophlebitis erhöht, sowie der Entstehung von Abszessen an der Injektionsstelle (DIAS & DE LACERDA NETO, 2013). Zudem kann eine Langzeit-Gabe von Antibiotika bei Pferden zu schwerwiegenden klinischen Manifestationen des Magen-Darm-Trakts wie Durchfall und Koliken führen, die

schlimmstenfalls tödlich für das Tier enden können (KEIR *et al.*, 1999; BARR *et al.*, 2013). Im Sinne des One-Health-Gedankens und des Wohlergehens des Patienten sollte eine unnötige Gabe dieser Art Medikamente deshalb unbedingt vermieden werden (MCEWEN & COLLIGNON, 2018).

Der wohl größte Nachteil des LIA A ist, dass in diesem Test das Protein OspA als für eine Infektion spezifisch bewertet wird (FAWCETT *et al.*, 2001; GOMES-SOLECKI *et al.*, 2002). Das OspA ist für Borrelien unabdingbar hinsichtlich der Adhäsion und Besiedlung des Zeckendarms, indem es an das Protein TROSPA im Gastro-Intestinal-Trakt der Zecke bindet (PAL *et al.*, 2000; PAL *et al.*, 2004a; YANG *et al.*, 2004). Jedoch wird das OspA nur in der Zecke und nicht mehr im Wirt exprimiert, wodurch dieser wenig bis gar nicht mit diesem Oberflächenprotein in Kontakt kommt und somit keine Ak gegen das OspA ausbilden kann (BATTISTI *et al.*, 2008) STRAUBINGER *et al.*, 1995 (DE SILVA *et al.*, 1996; PAL *et al.*, 2000; PAL *et al.*, 2004b). Bei einer Immunisierung gegen die LB hingegen wird Tieren Lysat-Impfstoff injiziert, was zur Bildung von Ak gegen das OspA der Borrelien führt. Deshalb sind Ag-Ak-Komplexe mit OspA spezifisch für eine Impfung, jedoch nicht für eine Infektion (CHANG *et al.*, 1995). Im Fall der Hundeseren lassen beide LIAs eine präzise Erkennung von Impfreaktionen zu, indem das Tier im Falle einer positiven Reaktion der OspA-Bande als „vac“ also geimpft deklariert wird. Sollten zusätzlich Ag-Ak-Reaktionen mit der VlsE-Bande, bei LIA A auch der C₆-Bande entstehen, so werden die Tiere als geimpft und infiziert diagnostiziert. Die equinen Kontrollseren aus dieser Studie stammen von Tieren, die mit Lysat-Impfstoff gegen Erreger des *Bbsl*-Komplexes geimpft worden waren (KNÖDLSIEDER *et al.*, 2019). Auf Grund der in Lysat-Impfstoffen vorhandenen Oberflächenproteine kann auch nach Impfung eine Bildung von Ak gegen mehrere Oberflächenproteine erwartet werden. Dieser Umstand sollte, wie bei Hunden, bei der Diagnostik geimpfter Pferde berücksichtigt werden sollte (STRAUBINGER *et al.*, 2001). So wäre es sinnvoll, bei geimpften Equiden die Reaktion aller Banden außer VlsE und C₆ als unspezifisch anzusehen. Im Gegensatz hierzu werden die Proteine VlsE und C₆ nur *in vivo* von Borrelien exprimiert, und der Nachweis von Ak gegen diese ist somit beweisend für eine aktive Infektion mit lebenden Erregern des *Bbsl*-Komplexes (MARANGONI *et al.*, 2008). Während der Herstellung des Impfstoffs haben die verwendeten Borrelien vermutlich das lineare Plasmid Ip 28-1 verloren, auf welchem das Gen Vls exprimiert wird (O'CONNOR *et al.*, 2004). Ist

dieses Plasmid nicht mehr vorhanden, können Borrelien das VlsE Lipoprotein nicht mehr exprimieren und somit werden gegen dieses keine Ag in geimpften Tieren gebildet (LIANG *et al.*, 1999b; O'CONNOR *et al.*, 2004; TOPFER & STRAUBINGER, 2007; KNÖDLESEDER *et al.*, 2019; WILCZEK *et al.*, 2022). Nach Bestätigung dieser Annahmen, könnten die equiden Proben nach demselben Auswertungsprotokoll wie geimpfte Hunde diagnostiziert werden. Um genauere Aussagen über die Reaktionen verschiedener Borrelien-spezifischer Proteine bei geimpften Pferden treffen zu können, wäre eine Studie mit einer größeren Anzahl vakzinierter Equiden hilfreich.

Um die Diagnosestellung mit LIA A weiter zu optimieren, wäre eine Reduktion der Ag-Streifen auf diesem Test angebracht. So hat die p100-Bande dieses LIAs die mit Abstand stärksten Farbreaktionen in allen Gruppen equiner Proben. Das p100 sowie das p83 gehören zu Epitopen, die mit dem protoplasmatischen Zylinder und Endoflagellen von Borrelien assoziiert werden (EIFFERT *et al.*, 1992; LUFT *et al.*, 1992). Beide Proteine sind höchst sensitive Ag in einer fortgeschrittenen Infektion mit Erregern des *Bbsl*-Komplexes und ähneln sich vor allem für die Spezies *Bbss* und *B. afzelii* (WILSKE *et al.*, 1993c; RASIAH *et al.*, 1994). Untersuchungen mittels PCR, DNA-Sequenzierung und Restriktionsenzymanalysen zeigten größere Unterschiede bei der Spezies *B. garinii* (RÖSSLER *et al.*, 1995). Ditton *et al.* argumentierten in ihrer Studie, in der die N-terminalen Aminosäuresequenzen von p100/p83 mit der N-terminalen Sequenz des p94 abgeglichen wurden, dass die Proteine p100, p83 sowie p94 wohl identisch seien (DITTON *et al.*, 1992). In LIA A reagierten 170 Pferde deutlich mit Ag des p100, was 85 % der 200 getesteten Pferde entspricht. Die unspezifische Reaktion dieser Proteinbande könnte mitunter ein Grund für die deutlich höhere Anzahl der positiv diagnostizierten equinen Proben im Vergleich zu LIA B sein. Während laut LIA A insgesamt 40,7 % aller Pferdeseren Antikörperreaktionen gegen Borrelien zeigten, sind es bei LIA B nur 23,3 % der Tiere. Die dem p100 ähnliche p83-Bande reagiert im LIA B mit 61 % der equinen Proben. Zieht man alle Reaktionen der Proteinbanden im Zusammenhang mit positiver Diagnose der Pferde in Betracht, so reagieren p100 und p83 sehr häufig und könnten ein Grund für eine Überdiagnose von einer Borrelieninfektion sein. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu beheben, könnte die Entfernung der eben genannten Banden bei der Untersuchung von Pferdeseren in LIAs sein.

Von allen untersuchten equinen Proben reagierten im LIA A nur zwei Tiere (RKS-B-5442-E, RKS-B-5558-E) positiv für die C₆-Bande und negativ für die VlsE-Bande. Das Pferd der Probe RKS-B-5442-E war im LIA A grenzwertig, im LIA B wurde dieses Tier als Borrelien-negativ diagnostiziert. Beide Tests beurteilten die Probe des Tieres RKS-B-5558-E als grenzwertig. Insgesamt wurde bei 37 Pferden eine Reaktion der VlsE-Bande ohne gleichzeitiges Reagieren der C₆-Bande im LIA A beobachtet. Nach derzeitigem Wissensstand gibt es keine Studien oder Erkenntnisse darüber, wie sich die Immunantwort von Pferden zu VlsE im Vergleich zu C₆ darstellt. Wie oben bereits genannt, ist das C₆ ein synthetisch hergestellter Abschnitt des VlsE-Lipoproteins, welches aus mehreren invariablen Regionen besteht. Zwar können in den Seren infizierter Pferde mehr IR6-spezifische Ag als beispielsweise Ag für IR2 oder IR4 nachgewiesen werden, jedoch ist auch die Exponierung von IR6 auf der Oberfläche des VlsE begrenzt (EMBERS *et al.*, 2007). Anhand der Ergebnisse dieser Studie lässt sich vermuten, dass equine Ak bevorzugt an die Bande des VlsE binden, im Vergleich zu der des C₆-Proteins. Wie auch schon bei den caninen Seren besteht demnach kein Vorteil, aber auch kein Nachteil in der Separierung von VlsE und C₆ in der Untersuchung equiner Seren mit dem LIA A. Da in eben genanntem Test jedoch weitaus mehr Pferde positiv für die VlsE-Bande reagierten als in LIA B (122 vs. 85), ist die Reaktivität dieses Proteins in LIA wohl zu hoch. Bestärkt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass die ursprüngliche Gruppe der seropositiven sowie grenzwertigen Pferde aus jeweils 50 Tieren bestand, LIA A jedoch 59 Tiere als mit Borrelien infiziert diagnostiziert hat.

Zusammenfassend machen die Ergebnisse die Schwierigkeit der Diagnosestellung der equinen LB sichtbar. Wie auch schon in anderen Studien diskutiert wurde, wird hier die Dringlichkeit deutlich, die Diagnostik der equinen LB zu standardisieren und zu optimieren (SCHÖNERT *et al.*, 2008a; DIVERS *et al.*, 2018).

2 Handhabung der LIAs zum Nachweis einer Borrelieninfektion

In der Handhabung gleichen die beiden LIAs sich sehr: in der Lieferung enthalten sind die Teststreifen (20 beim LIA A vs. 32 beim LIA B), Verdünnungs-/Waschpuffer, Sekundär-Ak (als fertige Mischung beim LIA A, als

Konzentrat beim LIA B), Cut-Off-Konzentrat sowie Substrat. Jedes Testkit des LIA A enthält zudem zwei Inkubationswannen, welche beim LIA B gesondert bei der Firma angefordert werden müssen. Nur für Hunde sind Sekundär-Ak und Cut-Off beim LIA B im Testkit enthalten; für Pferde müssen diese extra erworben werden. Zudem ist der Sekundär-Ak des LIA B ein Konzentrat und muss vor Gebrauch mit Verdünnungs-/Waschpuffer verdünnt werden. Im Testkit des LIA A ist ein fertig angemischter Sekundär-Ak sowohl für Hunde als auch für Pferde enthalten, der die Handhabung erleichtert. Fehler beim Mischen oder Zugeben des Sekundär-Ak können somit vermieden werden. Die Inkubationszeiten differieren nur leicht, so bedarf es für Serum und Sekundär-Ak beim LIA A einer Inkubationszeit von 45 Minuten, und beim LIA B von 30 Minuten auf dem Kippschüttler. Das Substrat des LIA B hingegen muss zwei Minuten länger inkubieren als das des LIA A (12 Min. vs. 10 Min.).

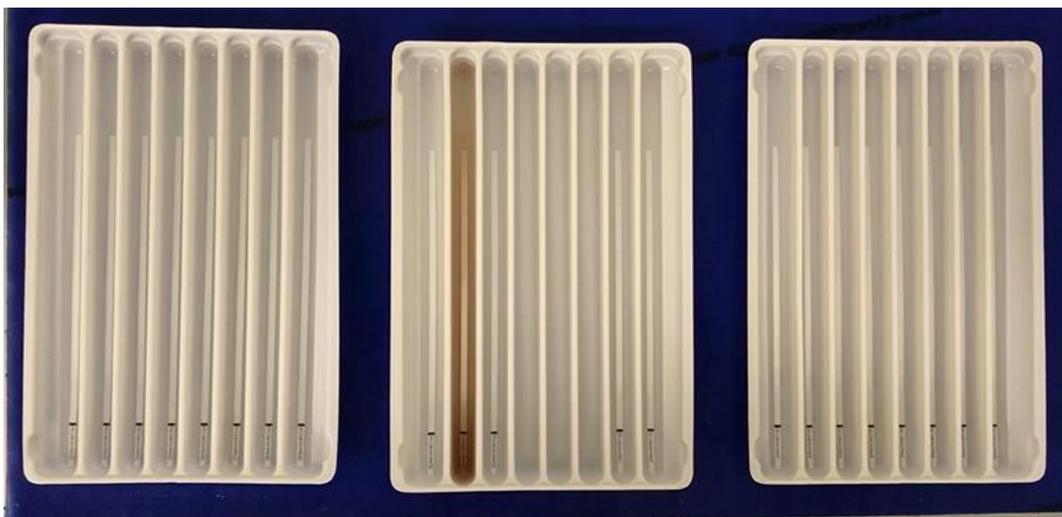


Abbildung 10: Inkubation von Serum auf dem Kippschüttler



Abbildung 11: Trocknen der fertigen Streifen auf Zellulosetüchern

Die Cut-Off-Bande des LIA B muss für jedes Testkit für Hunde und Pferde separat auf extra Streifen produziert werden. Das hierfür vorgesehene vorverdünnte Hundeserum ist im Testkit enthalten; für die equine Cut-Off-Kontrolle muss ein extra Testkit angefordert werden, in welchem vorverdünntes Pferdeserum, das anti-horse-IgG als Sekundärantikörper sowie ein Auswertungszettel für Pferde enthalten sind. Im LIA A ist die Cut-Off-Kontrolle auf jedem Streifen integriert und muss nicht gesondert angefertigt werden, wodurch Fehler bei der Anfertigung der Kontrollbande vermieden werden können.

Die Auswertung des LIA B erfolgt visuell mittels der erstellten Cut-Off-Kontrolle. Hierbei wird jede Proteinbande des Streifens einzeln mit dem Farbausschlag des Cut-Offs verglichen; Intensitäten werden in negativ (unterhalb des Cut-Off; -), schwach positiv (entspricht genau Cut-Off; +), mittelgradig positiv (stärker als der Cut-Off; ++) und stark positiv (deutlich stärker als der Cut-Off; +++) gegliedert. Entsprechend des mitgelieferten Auswertungsschemas kann das Tier als positiv, grenzwertig oder negativ gegen Erreger des *Bbsl*-Komplexes diagnostiziert werden. Hierbei muss immer die subjektive Wahrnehmung des Auswertenden berücksichtigt werden, vor allem wenn die Proteinbanden nur knapp unterhalb des Cut-Offs liegen bzw. genau dessen Farbausschlag entsprechen. Zudem können Lichtverhältnisse die wahrgenommene Intensität der Verfärbung beeinflussen, wodurch bei LIA B Fehler durch das menschliche Auge entstehen können. Im Lieferumfang des LIA A ist eine Software enthalten, welche mithilfe eines Scanners eine automatische Datenevaluierung ermöglicht. Die Intensität der Farbreaktion wird numerisch mit Zahlen von 0-9 angegeben; Werte oberhalb des Wertes 1 gelten als für diese Proteinbande positiv. Zusätzlich zu einem Auswertungsbogen für alle Proben erstellt das Computerprogramm für jeden Teststreifen und jedes Tier ein Auswertungsblatt und einen extra Ordner. Auch die letztendliche Befundung übernimmt das Computerprogramm, was eine objektive, schnellere Auswertung ermöglicht; die Diagnose kann zudem elektronisch direkt an den behandelnden Tierarzt weitergeleitet werden. Demnach ist LIA A in Bezug auf Handhabung und Auswertung die vorteilhaftere und objektivere Variante der Testmethodik, da menschliche Fehler vermieden werden und die numerische Auswertung eine leichtere statistische Datenerhebung erlaubt.

Jedoch konnte innerhalb dieser Studie bei mehreren Tieren (zwei Hunde, 17 Pferde) der Scan und damit Auswertungsprozess des LIA A aufgrund von

Softwareproblemen nicht durchgeführt werden. In diesen Fällen war eine visuelle Auswertung in der Bedienungsanleitung des LIAs vorgesehen. Diese stellte sich jedoch für LIA A verglichen zu LIA B als schwieriger dar, da die Cut-Off-Bande mit auf den Streifen integriert ist. Somit konnte die Cut-Off-Kontrolle nicht direkt gegengehalten werden und die farblichen Differenzen mussten geschätzt werden. Dies gelingt vielleicht noch für die der Kontrolle am nächsten liegenden zwei bis drei Banden, danach wird eine Interpretation jedoch immer schwieriger. Zudem hatte der Scanner des LIA A Probleme beim Ablesen von Streifen, die mit hämolytischem Serum inkubiert worden waren. Durch dieses kam es auf der Nitrozellulosemembran der Streifen zu Flecken, welche die Proteinbanden überlappten und somit eine Auswertung mittels des Scanners nicht zuließen (siehe Abbildung 18). In hämolytischem Serum werden intrazelluläre Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten aus den Blutzellen in das Plasma bzw. Serum freigesetzt (GUDER *et al.*, 2002). Diese können leicht an der Nitrozellulosemembran der LIA-Streifen haften und somit zu genanntem Sprengeln führen (STURGEON & VILJOEN, 2011; CLERICO *et al.*, 2018). Gründe für die Entstehung von hämolytischem Serum können Fehler im Rahmen der Blutentnahme (zu starke Aspiration, zu dünne Nadeln) sowie unsachgemäße Probenbehandlung (starkes Schütteln, Kühlen oder Erwärmen, zu lange Aufbewahrungszeiten) sein. Aber auch Medikamentengabe oder Vorerkrankungen wie Hämoglobinopathien oder erythrozytäre Enzymdefekte können zur Hämolyse der Probe führen (GUDER *et al.*, 2002). Die Nitrozellulosemembran des LIA A schien innerhalb dieser Studie anfälliger zu sein in Bezug auf Reaktionen mit hämolytischem Serum. Der Scanner deklarierte Pferdeseren als Hundeseren, da die Kontrollbande für canines Serum vermeintlich Farbreaktionen zeigte. Zudem wurden Farbsprengel als Ag-Ak-Reaktionen der Proteinbanden ausgewertet. Auch im LIA B konnten Reaktionen mit hämolytischem Serum verzeichnet werden. Hier verfärbte sich teils der ganze Streifen etwas dunkler, das korrekte Auswerten war jedoch trotzdem möglich (siehe Abbildung 19).



Abbildung 12: Beispielbild eines gesprenkelten Streifens des LIA A

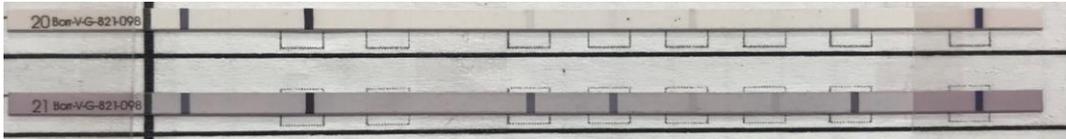


Abbildung 13: Beispiel eines nicht-verfärbten (oben) und verfärbten (unten) Streifens des LIA B

3 Diskussion der Ergebnisse der Forschung zur Speziesdifferenzierung

Ziel der weiterführenden Studien war es, eine serologische Methodik zur Differenzierung fünf humanpathogener Borrelienspezies in caninen und equinen Seren zu entwickeln. Hieraus könnten Rückschlüsse bezüglich der Pathogenität der einzelnen Spezies bei Hunden und Pferden gezogen werden.

Der *Bbsl*-Komplex besteht aus derzeit 21 Genospezies, welche eine humane LB verursachen können (CUTLER *et al.*, 2017; STANEK, 2018). Bei Hunden konnte bisher nur die Pathogenität von *Bbss* unter Laborbedingungen bewiesen werden (APPEL *et al.*, 1993; STRAUBINGER *et al.*, 1997a; STRAUBINGER *et al.*, 1998b; STRAUBINGER *et al.*, 1998a), für Pferde gelang dieser Versuch nicht (CHANG *et al.*, 2000a). Da jedoch sowohl bei Caniden als auch Equiden mit klinischen Manifestationen einer LB der Nachweis mehrerer Borrelienspezies gelang (SPECK *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2002; SKOTARCZAK & WODECKA, 2005; GRABNER *et al.*, 2008; KYBICOVÁ *et al.*, 2009; WODECKA *et al.*, 2009; LITTLE *et al.*, 2010; SCHÁNILEC *et al.*, 2010; IMAI *et al.*, 2011; ALHO *et al.*, 2016), liegt der Verdacht nahe, dass nicht nur *Bbss* bei Hunden sondern auch andere Spirochäten bei beiden Tierarten eine LB verursachen können. Bislang wurden Speziesdifferenzierungen für gewöhnlich mittels PCR-Untersuchungen von Gewebe rund um die Stichstelle der Zecke vorgenommen, da dies beste Ergebnisse liefert (STRAUBINGER, 2000; MARGOS *et al.*, 2010). Jedoch entstehen klinische Anzeichen einer LB erst Wochen nach dem Stich, und da Hunde und Pferde kein EM entwickeln, welches auf die Einstichstelle der Zecke schließen lässt, kann die Entnahme einer Gewebeprobe um diese Hautstelle unter Feldbedingungen oft nicht gewährleistet werden (STRAUBINGER *et al.*, 1998a; CHANG *et al.*, 2001). Deshalb wäre eine serologische Untersuchung auf Ak gegen verschiedene Borrelienspezies eine nicht-invasive und sichere Option der Differenzierung der Spirochäten.

In Zusammenarbeit mit der Firma VIROTECH Diagnostics GmbH (Rüsselsheim, Deutschland) wurde deshalb ein LIA zur Speziesdifferenzierung entwickelt. Auf dessen Nitrozellulosemembran waren Proteinbanden für die Spezies *B. afzelii*, *Bbss* Z27, *Bbss* B31, *B. bavariensis*, *B. garinii* und *B. spielmanii* jeweils für die Proteine DbpA und OspC aufgesprüht, sowie eine Serumkontrolle, eine VlsE-Bande zur

Kontrolle einer Infektion und eine OspA-Bande, um geimpfte Tiere nachweisen zu können. In der Validierung reagierten die Kontrollseren der Mäuse für alle Spezies außer *Bbss* unspezifisch. Da keine mit *B. garinii* infizierte Maus als Kontrolltier vorhanden war, konnte die Spezifität dieser Proteinbande nicht verifiziert werden. Zudem reagierten zwei der mit *Bbss* infizierten Hunde aus Versuchen an der Cornell University nicht für diese Spezies, wodurch auch bei den Ergebnissen der *Bbss*-Bande nicht für die Richtigkeit der Ergebnisse garantiert werden kann.

Beinahe die Hälfte der Borrelien-positiven caninen Seren (45,1 %) wies Infektionen mit einer einzelnen Borrelienspezies auf. Die Feldseren der Hunde reagierten hierbei am häufigsten mit Ag von *Bbss* (35,3 %), was den Ergebnissen anderer Studien zur Speziesdifferenzierung gleicht (HOVIUS *et al.*, 2000; SKOTARCZAK & WODECKA, 2005; WODECKA *et al.*, 2009). Bei den Proben aus der Gruppe der Borrelien-positiven Pferde reagierten 48,6 % für eine einzelne Spezies der Spirochäten, wobei *B. garinii* am häufigsten nachgewiesen werden konnte (25,7 %). Bisher gibt es als Vergleich zur Speziesdifferenzierung von Borrelien in equinen Seren nur eine einzige Studie, in welcher überwiegend Ak gegen Ag von *B. afzelii* gebildet wurden (MÜLLER *et al.*, 2002). Fast bei der Hälfte aller beprobten caninen Feldseren (43,1 %) konnte laut dem entwickelten LIA eine Mischinfektion mit mehreren Spezies von Borrelien festgestellt werden, wobei die Kombination von *Bbss* und *B. afzelii* am häufigsten vorkam (17,6 %). Bei den equinen Seren der Gruppe der Borrelien-positiven Pferde reagierten 45,7 % auf die Ag mehrerer Spezies, wobei meist eine Kombination von *Bbss*, *B. garinii* und *B. bavariensis* festgestellt werden konnte. Diese hohe Anzahl an Mischinfektionen bei sowohl caninen als auch equinen Seren lässt eine vorsichtige Vermutung zu, dass Mehrfachinfektionen bei Hunden und Pferden denkbar sind. Das Ausbleiben von Mischinfektionen bei den Seren der Cornell University unterstreicht diese Aussage. Inwieweit die verschiedenen Borrelienspezies zum Entstehen von klinischen Anzeichen der einer LB beitragen, lässt sich hieraus jedoch nicht schließen.

Der LIA zur serologischen Differenzierung von Borrelienspezies stellt eine interessante und für die Praxis äußerst wertvolle neue Methodik dar. Durch die nichtinvasive, schnelle und leichte Unterscheidung der Spezies könnte eine große Anzahl Feldproben in kürzester Zeit untersucht und beurteilt werden. Mithilfe einer größeren Anzahl untersuchter Seren könnten Rückschlüsse bezüglich der

Pathogenität verschiedener Borrelienspezies gezogen und somit die Frage beantwortet werden, ob bei Tieren wie beim Menschen auch mehr Spirochäten des *Bbsl*-Komplexes als nur *Bbss* klinische Anzeichen einer LB hervorrufen. Optimal wäre eine kontrollierte Infektion von SPF-Hunden und -Pferden mit verschiedenen Borrelienspezies unter Laborbedingungen. Hier könnten entstehende klinische Manifestationen direkt in Korrelation mit der jeweiligen Spirochäte gebracht werden und somit eine sichere Aussage in Bezug auf die Pathogenität der jeweiligen Borrelienspezies bei Caniden und Equiden getroffen werden. Hierfür bedarf der LIA zur Speziesdifferenzierung weiterer Entwicklungen und Anpassungen, um verifizierbare Ergebnisse zu erzielen. Die einzelnen Proteinbanden bedürfen weiterer Verbesserung, um Kreuzreaktionen ausschließen zu können und eine Verfärbung am Streifen als sichere Infektion mit der jeweiligen Spezies zu betiteln. Leider war eine weitere Entwicklung des Tests im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, wäre aber ein schöner Ansatz für eine neue Doktorarbeit.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Lyme-Borreliose ist weltweit eine der am weitesten verbreiteten durch Zecken übertragenen Krankheiten. Der heutige Goldstandard zum Nachweis der Borrelien-Infektion ist ein Zweistufenverfahren, in dem als erster Schritt ein kinetischer ELISA zur quantitativen Ak-Bestimmung und als zweiter Schritt ein LIA zur qualitativen Differenzierung positiver ELISA-Ergebnisse durchgeführt wird.

Ziel dieser Studie war es, zwei verschiedene LIAs hinsichtlich ihrer Handhabung und Resultate zu vergleichen, und somit eine Optimierung der Lyme-Borreliose-Diagnostik bei Hunden und Pferden zu ermöglichen. Hierfür wurden 200 canine und 200 equine Seren im betriebseigenen KELA, sowie mit LIA A und LIA B auf Borrelien-spezifische Ak untersucht.

Der LIA A erleichtert im Vergleich zum LIA B einige Arbeitsschritte und erlaubt eine automatische Auswertung der Ergebnisse mithilfe eines Scanners, welcher jedoch mit hämolytischem Serum Probleme hatte. Auch scheint der cut-off des LIA A für equine Seren etwas zu niedrig angesetzt zu sein, da fast die Hälfte der 200 Proben als seropositiv diagnostiziert wurden. Für den Einsatz bei geimpften Pferden gibt es bei beiden LIAs Verbesserungsbedarf. Im Fall von LIA A war vor allem die Interpretation der Reaktion der OspA-Bande als infektionsspezifisch kritisch anzusehen. Mittlerweile wurden beim LIA A Änderungen in Bezug auf hämolytisches Probenmaterial und die Rolle des OspA vorgenommen.

Der LIA B liefert weniger falsch-positive Ergebnisse und ist vor allem in Bezug auf equine Proben zuverlässiger in der Befundung und hier demnach die bessere Option. Bei der Untersuchung caniner Proben liefern beide Tests zufriedenstellende Ergebnisse. Aufgrund des Scanners und der automatischen Auswertung des LIA A im Vergleich zur visuellen Diagnosestellung des LIA B ist Ersterer bei einer Probenevaluierung mit wissenschaftlichem Hintergrund das Mittel der Wahl, da die Auswertungen leichter vergleichbar und statistisch erfassbar sind. Zudem kann menschlichen Fehlern vorgebeugt werden.

Der Spezies-LIA wäre eine nichtinvasive, schnelle und demnach für die Praxis wertvolle Methode der Differenzierung von Erregern des *Bbsl*-Komplexes. Die Vermutung, dass wie beim Menschen auch bei Tieren mehrere Spezies als nur *Bbss*

zu klinischen Anzeichen einer LB führen, könnte dadurch bewiesen werden. Aufgrund der Kreuzreaktionen bei den caninen und murinen Kontrollseren, sowie der nicht möglichen Überprüfung der Bande von *B. garinii*, konnten die entstandenen Ergebnisse nicht verifiziert werden. Da diese Methodik der Diagnostik interessante neue Sichtweisen auf canine und equine LB liefern könnte, sollte der Spezies-LIA unbedingt weiterentwickelt und optimiert werden.

VII. SUMMARY

Lyme borreliosis is one of the most common vector-borne diseases in the world. Today's standard to diagnose the infection with *Borrelia* is a two-tiered test based on a kinetic ELISA as the first step for a quantitative antibody detection and a LIA as the second step for a qualitative differentiation and confirmation of positive results in the KELA. The aim of this study was the comparison of two commercially available LIAs to enable an easy and efficient diagnosis of canine and equine LB.

The sera of 200 dogs and 200 horses were tested in the in-house KELA, LIA A and LIA B. Results were compared regarding sensitivity, specificity and diagnostic outcome as well as the operability of the two tests. In 94.0 % of canine sera, results agreed between the two LIAs and the tests provide results satisfyingly. For horses, the accordance of both tests reached 65.5 %, which reflects the challenge equine samples still provide in LB diagnostic. The LIA A allows a simple, simultaneous analysis of canine and equine sera as the conjugate of this LIA comes as a ready for use mixture in the kit and is compatible with both animal species. The conjugate of LIA B requires an extra work step, in which conjugate concentrates for each canine and equine samples are mixed with washing buffer prior to testing. Furthermore, the scanning program of LIA A allows an easy and automatic analysis and evaluation of the strips, and creates diagnostic reports, which can be send to the owner or the nursing veterinarian. Still, strips from LIA A that had been incubated with haemolytic serum samples became speckled and became unreadable for the scanner. LIA B created fewer false-positive results and therefore seems more reliable than LIA A. Both LIAs require improvement for vaccinated horses, as the instructions for use of LIA B do not clarify the evaluation of the strips with reactions on the OspA-protein band. In the case of LIA A, reactions against the OspA Ag-line should be changed from specific for infection to specific for vaccination. On the manufacturer's website of LIA A, the role of OspA Ag during infection and the evaluation scheme for vaccinated horses have been adjusted.

For equine samples, diagnosing LB is a delicate topic, which requires further investigation. A greater extent of investigation regarding background reactions and cross reactions testing equine samples in both LIAs would be the next step to optimize the diagnosis of LB in horses.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

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

Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiological Reviews* 2005; 18: 484-509.

Alho AM, Pita J, Amaro A, Amaro F, Schnyder M, Grimm F, Custodio AC, Cardoso L, Deplazes P, de Carvalho LM. Seroprevalence of vector-borne pathogens and molecular detection of *Borrelia afzelii* in military dogs from Portugal. *Parasites & Vectors* 2016; 9: 225.

Appel M. Lyme disease in dogs and cats. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 1990; 12: 617-26.

Appel MJ, Allan S, Jacobson RH, Lauderdale TL, Chang YF, 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.

Aristowsky W, Hoeltzer R. Bemerkungen zur Morphologie der *Spirochaeta obermeieri*. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1924; 91: 175-8.

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.

Bae JM. Horses as a Potential Reservoir of Lyme Borreliosis in Jeju-do, Korea. *J Prev Med Public Health* 2018; 51: 213-4.

Balashov YS (1967) Blood-sucking ticks (Ixodoidea)-vectors of diseases of man and animals

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

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

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

Barnetson R, Gawkrödger D. Zelluläre Reaktionen bei der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ. In: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Roitt IM, Brostoff J, Male DK, eds. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1995: 316.

Barr BS, Walldridge BM, Morresey PR, Reed SM, Clark C, Belgrave R, Donecker JM, Weigel DJ. Antimicrobial-associated diarrhoea in three equine referral practices. Equine Vet J 2013; 45: 154-8.

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

Bartol J. Is Lyme disease overdiagnosed in horses? Equine Veterinary Journal 2013; 45: 529-30.

Battisti JM, Bono JL, Rosa PA, Schrupf ME, Schwan TG, Policastro PF. Outer surface protein A protects Lyme disease spirochetes from acquired host immunity in the tick vector. Infect Immun 2008; 76: 5228-37.

Bauer Y, Hofmann H, Jahraus O, Mytilineos J, Simon MM, Wallich R. Prominent T cell response to a selectively in vivo expressed *Borrelia burgdorferi* outer surface protein (pG) in patients with Lyme disease. *European Journal of Immunology* 2001; 31: 767-76.

Baum E, Grosenbaugh DA, Barbour AG. Diversity of antibody responses to *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected beagle dogs. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014; 21: 838-46.

Benach JL, Fleit HB, Habicht GS, Coleman JL, Bosler EM, Lane BP. Interactions of phagocytes with the Lyme disease spirochete: Role of the Fc receptor. *Journal of Infectious Diseases* 1984; 150: 497-507.

Berg D, Abson KG, Prose NS. The laboratory diagnosis of Lyme disease. *Archives of Dermatology* 1991; 127: 866-70.

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

Bhide M, Yilmaz Z, Golcu E, Torun S, Mikula I. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in dogs and horses in Turkey. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2008; 15: 85-90.

Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases* 2007; 13: 1208.

Bono JL, Tilly K, Stevenson B, Hogan D, Rosa PA. Oligopeptide permease in *Borrelia burgdorferi*: putative peptide-binding components encoded by both chromosomal and plasmid loci. *Microbiology* 1998; 144: 1033-44.

Brade V, Hunfeld K-P. Borrelien. In: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*: Springer 2009: 383-9.

Bradshaw GL, Thueson RK, Uriona TJ. Improved serodiagnostic performance for Lyme disease by use of two recombinant proteins in enzyme-linked immunosorbent assay compared to standardized two-tier testing. *Journal of Clinical Microbiology* 2017; 55: 3046-56.

Brettschneider S, Bruckbauer H, Klugbauer N, Hofmann H. Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 2658-65.

Breu D, Müller E. Heterogeneity of canine immune responses to *Borrelia burgdorferi* in a line immunoassay comprising recombinant VlsE and C6 peptide. *Tierärztliche Praxis / Ausgabe K, Kleintiere, Heimtiere* 2017; 45: 295-300.

Browning A, Carter SD, Barnes A, May C, Bennett D (1993) Lameness associated with *Borrelia burgdorferi* infection in the horse. *British Medical Journal Publishing Group*

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

Bundestierärztekammer. Anmerkungen zur neuen TÄHAV. *Deutsches Tierärzteblatt* 2018; 213-6: 1208-15.

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

Burgdorfer W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 1984; 57: 515.

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

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

Burgess EC. *Borrelia burgdorferi* infection in Wisconsin horses and cows. Annals of the New York Academy of Sciences 1988; 539: 235-43.

Burgess EC, Gendron-Fitzpatrick A, Mattison M (1988) Foal mortality associated with natural infection of pregnant mares with *Borrelia burgdorferi*. Equine infectious diseases V. Proceedings of the Fifth International Conference. University Press of Kentucky, Lexington. 217-20

Burgess EC, Gendron-Fitzpatrick A (1990) Experimental infection of equines with *Borrelia burgdorferi*. Lyme Borreliosis 1990, Stockholm (Sweden), 18-21 Jun 1990

Burgess EC. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. American Journal of Veterinary Research 1992; 53: 1507-11.

Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, Fingerle V, Nitschko H, Wilske B, Preac-Mursic V. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. Journal of Clinical Microbiology 1996; 34: 1072-8.

Butler CM, Houwers DJ, Jongejan F, van der Kolk JH. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. Veterinary Quarterly 2005; 27: 146-56.

Bykowski T, Babb K, von Lackum K, Riley SP, Norris SJ, Stevenson B. Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. Journal of Bacteriology 2006; 188: 4879-89.

Cabello FC, Embers ME, Newman SA, Godfrey HP. *Borrelia burgdorferi* Antimicrobial-Tolerant Persistence in Lyme Disease and Posttreatment Lyme Disease Syndromes. *mBio* 2022; 13: e0344021.

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. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 3670-4.

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

Casjens S, Fraser-Liggett CM, Mongodin EF, Qiu W-G, Dunn JJ, Luft BJ, Schutzer SE. Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of Bacteriology* 2011; 193: 1489-90.

Casjens SR, Gilcrease EB, Winn-Stapley DA, Schicklmaier P, Schmieger H, Pedulla M, Ford ME, Houtz JM, Hatfull GF, Hendrix RW. The generalized transducing *Salmonella* bacteriophage ES18: Complete genome sequence and DNA packaging strategy. *Journal of Bacteriology* 2005; 187: 1091-104.

Cassatt DR, Patel NK, Ulbrandt ND, Hanson MS. DbpA, but not OspA, is expressed by *Borrelia burgdorferi* during spirochetemia and is a target for protective antibodies. *Infection and Immunity* 1998; 66: 5379-87.

Chandrashekar R, Daniluk D, Moffitt S, Lorentzen L, Williams J. Serologic diagnosis of equine borreliosis: Evaluation of an in-clinic enzyme-linked immunosorbent assay (SNAP (R) 4Dx (R)). *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 2008; 6: 145-50.

Chang Y-F, Novosol V, McDonough SP, Chang C-F, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Vaccination against Lyme disease with recombinant

Borrelia burgdorferi outer-surface protein A (rOspA) in horses. *Vaccine* 1999; 18: 540-8.

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

Chang YF, Novosol V, McDonough SP, Chang CF, Jacobson RH, Divers T, Quimby FW, Shin S, Lein DH. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Veterinary Pathology* 2000a; 37: 68-76.

Chang YF, McDonough SP, Chang CF, Shin KS, Yen W, Divers T. Human granulocytic ehrlichiosis agent infection in a pony vaccinated with a *Borrelia burgdorferi* recombinant OspA vaccine and challenged by exposure to naturally infected ticks. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2000b; 7: 68-71.

Chang YF, Novosol V, Chang CF, Summers BA, Ma DP, Chiang YW, Acree WM, Chu HJ, Shin S, Lein DH. Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. *American Journal of Veterinary Research* 2001; 62: 1104-12.

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

Charon NW, Goldstein SF. Genetics of motility and chemotaxis of a fascinating group of bacteria: The spirochetes. *Annual Review of Genetics* 2002; 36: 47-73.

Chu C-Y, Liu W, Jiang B-G, Wang D-M, Jiang W-J, Zhao Q, Zhang P-H, Wang Z-X, Tang G-P, Yang H. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 3130-3.

Clark KL, Leydet BF, Threlkeld C. Geographical and genospecies distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA detected in humans in the USA. *Journal of Medical Microbiology* 2014; 63: 674-84.

Clerico A, Belloni L, Carrozza C, Correale M, Dittadi R, Dotti C, Fortunato A, Vignati G, Zucchelli GC, Migliardi M. A Black Swan in clinical laboratory practice: the analytical error due to interferences in immunoassay methods. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56: 397-402.

Cohen DP, Bosler EM, Bernard W, II DM, Eisner R, Schulze TL. Epidemiologic studies of Lyme disease in horses and their public health significance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988; 539: 244-57.

Cohen ND, Heck FC, Heim B, Flad DM, Bosler EM, Cohen DP. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 201: 1030-4.

Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schafer SM, Vitorino L, Goncalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 1316-8.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1941; 47: 200-2.

Cox DL, Akins DR, Bourell KW, Lahdenne P, Norgard MV, Radolf JD. Limited surface exposure of *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1996; 93: 7973-8.

Craft JE, Grodzicki RL, Steere AC. Antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *Journal of Infectious Diseases* 1984; 149: 789-95.

Craft JE, Fischer DK, Shimamoto GT, Steere AC. Antigens of *Borrelia burgdorferi*

recognized during Lyme disease. Appearance of a new immunoglobulin M response and expansion of the immunoglobulin G response late in the illness. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 78: 934-9.

Crippa M, Rais O, Gern L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2002; 2: 3-9.

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

Czerkinsky C, Andersson G, Ekre H-P, Nilsson L-Å, Klareskog L, Ouchterlony Ö. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *Journal of Immunological Methods* 1988; 110: 29-36.

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.

Day MJ. The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit Vectors* 2011; 4: 48.

de Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio MS. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clinical Rheumatology* 2008; 27: 1587-91.

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.

des Vignes F, Piesman J, Heffernan R, Schulze TL, Stafford III KC, Fish D. Effect

of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *The Journal of Infectious Diseases* 2001; 183: 773-8.

Dessau RB, Fingerle V, Gray J, Hunfeld K-P, Jaulhac B, Kahl O, Kristoferitsch W, Stanek G, Strle F. The lymphocyte transformation test for the diagnosis of Lyme borreliosis has currently not been shown to be clinically useful. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: O786-O7.

Detmer SE, Bouljihad M, Hayden DW, Schefers JM, Armien A, Wünschmann A. Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2016; 28: 144-9.

Dias DP, de Lacerda Neto JC. Jugular thrombophlebitis in horses: a review of fibrinolysis, thrombus formation, and clinical management. *Can Vet J* 2013; 54: 65-71.

Ditton HJ, Neuss M, Zoller L. Evidence that *Borrelia burgdorferi* immunodominant proteins p100, p94 and p83 are identical. *FEMS Microbiology Letters* 1992; 73: 217-20.

Divers TJ, Chang YF, Jacobson RH, Mcdonough SP. Lyme disease in horses. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian-North American Edition-* 2001; 23: 375-82.

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

Divers TJ, Gardner RB, Madigan JE, Witonsky SG, Bertone JJ, Swinebroad EL, Schutzer SE, Johnson AL. *Borrelia burgdorferi* Infection and Lyme disease in North American horses: A consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2018; 32: 617-32.

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

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. *Veterinary Sciences* 2022; 9: 633.

Durrani AZ, Goyal SM. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses in Minnesota. *Journal of Animal and Plant Sciences* 2011; 21: 8-11.

Ebani VV, Bertelloni F, Pinzauti P, Cerri D. Seroprevalence of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Italian horses. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2012; 19: 237-40.

Egenvall A, Franzén P, Gunnarsson A, Engvall EO, Vågsholm I, Wikström U-B, Artursson K. Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic *Ehrlichia* spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses. *Preventive Veterinary Medicine* 2001; 49: 191-208.

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

Eiffert H, Schlott T, Hoppert M, Lotter H, Thomssen R. Identification of an endoflagellar associated protein in *Borrelia burgdorferi*. *J Med Microbiol* 1992; 36: 209-14.

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

Estrada-Peña A, Cutler S, Potkonjak A, Vassier-Tussaut M, Van Bortel W, Zeller H, Fernandez-Ruiz N, Mihalca AD. An updated meta-analysis of the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks in Europe. International Journal of Health Geographics 2018; 17: 41.

European Medicines Agency. Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health. 2020: <https://www.ema.europa.eu/en/news/categorisation-antibiotics-used-animals-promotes-responsible-use-protect-public-and-animal-health#x>. 07/12.

Evison J, Aebi C, Francioli P, Péter O, Bassetti S, Gervais A. Abklärung und Therapie der Lyme-Borreliose bei Erwachsenen und Kindern. Schweizerische Ärztezeitung 2005; 42: 2375-84.

Fawcett PT, Rose CD, Budd SM, Gibney KM. Effect of immunization with recombinant OspA on serologic tests for Lyme borreliosis. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8: 79-84.

Feder B, Joseph R, Moroff S, Schneider EM, Bosler EM (1991) *Borrelia burgdorferi* antibodies in canine cerebrospinal fluid. Proceedings of the 9th Annual Meeting of Veterinary Medicine Forum, ACVIM

Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. Journal of Clinical Microbiology 1995; 33: 1867-9.

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. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 1456-63.

Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special

respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. International Journal of Medical Microbiology 2008; 298: 279-90.

Fingerle V, Eiffert H, Gessner A, Göbel UB, Hofmann H, Hunfeld KP, Krause A, Pfister HW, Reischl U, Sing A (2017) MiQ 12: Lyme-Borreliose. Elsevier, Urban and Fischer, Munich. 1-74

Foldvari G, Farkas R, Lakos A. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. Emerging Infectious Diseases 2005; 11: 1794-5.

Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Watthey L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997; 390: 580-6.

Fritz CI (2018) Retrospektive Betrachtung serologischer Ergebnisse verschiedener Borrelien-Antikörper-Nachweisverfahren unter dem Aspekt einer möglichen Kategorisierung klinischer Befunde bei Equiden. LMU München, Munich

Fritz CL, Kjemtrup AM. Lyme borreliosis. Journal of the American Veterinary Medical Association 2003; 223: 1261-70.

Fukunaga M, Hamase A, Okada K, Nakao M. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: Rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. Microbiology and Immunology 1996; 40: 877-81.

Funk RA, Pleasant RS, Witonsky SG, Reeder DS, Werre SR, Hodgson DR. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses presented for coggins testing in Southwest Virginia and change in positive test results approximately 1 year later. Journal of Veterinary Internal Medicine 2016; 30: 1300-4.

Gall Y, Pfister K. Survey on the subject of equine Lyme borreliosis. *International Journal of Medical Microbiology* 2006; 296 Suppl 40: 274-9.

Gehlen H, Inerle K, Bartel A, Stöckle SD, Ulrich S, Briese B, Straubinger RK. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* Infections in German Horses. *Animals (Basel)* 2023; 13

Gerber B, Eichenberger S, Wittenbrink MM, Reusch CE. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. *BMC Veterinary Research* 2007; 3: 15.

Gerber B, Eichenberger S, Haug K, Wittenbrink MM. The dilemma with Lyme borreliosis in the dog with particular consideration of "Lyme nephritis". *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2009; 151: 479-83.

Gerhards H, Wollanke B. Antibody titers against *Borrelia* in horses in serum and in eyes and occurrence of equine recurrent uveitis. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 1996; 109: 273-8.

Gern L, Humair P-F. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control* 2002; 6: 149-74.

Gern L. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Current Problems in Dermatology* 2009; 37: 18-30.

Gibson MD, Omran MT, Young CR. Experimental feline Lyme borreliosis as a model for testing *Borrelia burgdorferi* vaccines. In: *Immunobiology of Proteins and Peptides VIII*: Springer 1995: 73-82.

Gilmore RD, Jr., Piesman J. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infection and Immunity* 2000; 68: 411-4.

Gomes-Solecki MJ, Wormser GP, Schriefer M, Neuman G, Hannafey L, Glass JD, Dattwyler RJ. Recombinant assay for serodiagnosis of Lyme disease regardless of OspA vaccination status. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 193-7.

Grabner A, Gall Y, Palm K, Schönert S, Pfister K. Lyme-Borreliose bei einem Pony mit Meningitis?–Vergleichende Diagnostik. *Leipziger Blaue Hefte* 2008: 53.

Gray JS. Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wiener klinische Wochenschrift* 2002; 114: 473-8.

Guder WG, Ehret W, Da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Müller-Plathe O, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Die Qualität diagnostischer Proben. *Laboratoriums Medizin* 2002; 26: 267-83.

Guérin M, Shawky M, Zedan A, Octave S, Avalue B, Maffucci I, Padiolleau-Lefèvre S. Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiol* 2023; 23: 204.

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

Haas L, Beer M. Indirekter Erregernachweis. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 81.

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

Hansen MG, Christoffersen M, Thuesen LR, Petersen MR, Bojesen AM. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2010; 52: 3.

Hauser U, Lehnert G, Lobentanzer R, Wilske B. Interpretation criteria for standardized Western blots for three European species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 1433-44.

Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Diagnostic value of proteins of three *Borrelia* species (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) and implications for development and use of recombinant antigens for serodiagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1998; 5: 456-62.

Hauser U, Lehnert G, Wilske B. Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 2241-7.

Herzberger P, Siegel C, Skerka C, Fingerle V, Schulte-Spechtel U, van Dam A, Wilske B, Brade V, Zipfel PF, Wallich R, Kraiczy P. Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infection and Immunity* 2007; 75: 4817-25.

Herzer P, Fingerle V, Pfister H-W, Krause A. Lyme-Borreliose. *Der Internist* 2014; 55: 789-804.

Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ. Cutting edge: Inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of Immunology* 1999; 163: 2382-6.

Houben R, Meersschaert C, Hendrickx G, Pitel PH, Amory H. Modelling the probability and impact of false-positive serology for *Borrelia burgdorferi* sensu lato: A case study. *Equine Veterinary Journal* 2020;

Hovius JW, Hovius KE, Oei A, Houwers DJ, van Dam AP. Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 2611-21.

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

Hovius KE, Stark LA, Bleumink-Pluym NM, van de Pol I, Verbeek-de Kruif N, Rijpkema SG, Schouls LM, Houwers DJ. Presence and distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in internal organs and skin of naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs, as detected by polymerase chain reaction. *Veterinary Quarterly* 1999; 21: 54-8.

Hu LT, Klempner MS. Host-pathogen interactions in the immunopathogenesis of Lyme disease. *Journal of Clinical Immunology* 1997; 17: 354-65.

Hulinska D. Diagnosis of Lyme borreliosis with western blotting. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Immunologie* 1997; 46: 3-8.

Imai DM, Barr BC, Daft B, Bertone JJ, Feng S, Hodzic E, Johnston JM, Olsen KJ, Barthold SW. Lyme neuroborreliosis in 2 horses. *Veterinary Pathology* 2011; 48: 1151-7.

Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, Cabello J, Cabello C, Daniels TJ, Godfrey HP. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environmental Microbiology* 2014; 16: 1069-80.

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

Jäderlund KH, Egenvall A, Bergström K, Hedhammar Å. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs with neurological signs. *Veterinary Record* 2007; 160: 825-31.

James FM, Engiles JB, Beech J. Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010; 237: 1180-5.

Jauris-Heipke S, Liegl G, Preac-Mursic V, Rossler D, Schwab E, Soutschek E, Will G, Wilske B. Molecular analysis of genes encoding outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Relationship to OspA genotype and evidence of lateral gene exchange of OspC. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 1860-6.

Jauris-Heipke S, Rößle B, Wanner G, Habermann C, Rössler D, Fingerle V, Lehnert G, Lobentanzer R, Pradel I, Hillenbrand B. Osp17, a novel immunodominant outer surface protein of *Borrelia afzelii*: Recombinant expression in *Escherichia coli* and its use as a diagnostic antigen for serodiagnosis of Lyme borreliosis. *Medical Microbiology and Immunology* 1999; 187: 213-9.

Jin C, Roen DR, Lehmann PV, Kellermann GH. An enhanced ELISPOT assay for sensitive detection of antigen-specific T cell responses to *Borrelia burgdorferi*. *Cells* 2013; 2: 607-20.

Johnson RC, Hyde FW, Rumpel C. Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 1984a; 57: 529.

Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1984b; 34: 496-7.

Johnstone LK, Engiles JB, Aceto H, Buechner-Maxwell V, Divers T, Gardner RB, Levine R, Scherrer N, Tewari D, Tomlinson J. Retrospective evaluation of horses diagnosed with neuroborreliosis on postmortem examination: 16 cases (2004–2015). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30: 1305-12.

Karlsson M, Hovind-Hougen K, Svenungsson B, Stiernstedt G. Cultivation and characterization of spirochetes from cerebrospinal fluid of patients with Lyme

borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 473-9.

Käsbohrer A, Schönberg A. Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West). *Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift* 1990; 103: 374-8.

Kawabata H, Masuzawa T, Yanagihara Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and Immunology* 1993; 37: 843-8.

Keir AA, Stämpfli HR, Crawford J. Outbreak of acute colitis on a horse farm associated with tetracycline-contaminated sweet feed. *Can Vet J* 1999; 40: 718-20.

Kight E, Alfaro R, Gadila SKG, Chang S, Evans D, Embers M, Haselton F. Direct Capture and Early Detection of Lyme Disease Spirochete in Skin with a Microneedle Patch. *Biosensors (Basel)* 2022; 12

Kim SE, Kim S, Jeong M, Lee Y, Ahn JT, Park YW, Ahn JS, Lee E, Ryu D-Y, Seo K. Experimental determination of a subantimicrobial dosage of doxycycline hyclate for treatment of periodontitis in Beagles. *American Journal of Veterinary Research* 2013; 74: 130-5.

Kiss T, Cadar D, Krupaci AF, Bordeanu A, Brudasca GF, Mihalca AD, Mircean V, Gliga L, Dumitrache MO, Spinu M. Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2011; 11: 1259-62.

Knauer J, Krupka I, Fuedner C, Lehmann J, Straubinger RK. Evaluation of the preventive capacities of a topically applied azithromycin formulation against Lyme borreliosis in a murine model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011; 66: 2814-22.

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.

Kochi SK, Johnson RC, Dalmasso AP. Complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Role of antibody in formation of an effective membrane attack complex. *The Journal of Immunology* 1991; 146: 3964-70.

Korshus JB, Munderloh UG, Bey RF, Kurtti TJ. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding. *Med Microbiol Immunol* 2004; 193: 27-34.

Kramer MD, Moter S, Starke F, Hofmann H, Simon MM, Wallich R (1992) Laboratoriumsdiagnostik bei der *B. burgdorferi*-Infektion des Menschen ("Lyme-Borreliose"). *Lyme-Borreliose: Neue Aspekte in Klinik und Diagnostik, II. Erlanger Borreliose-Symposium. Erlangen. 67-91*

Krause A, Fingerle V. Diagnostik & Therapie der Lyme-Borreliose. *CME* 2014; 11: 7-16.

Krupka I, Knauer J, Lorentzen L, O'Connor TP, Saucier J, Straubinger RK. *Borrelia burgdorferi sensu lato* species in Europe induce diverse immune responses against C6 peptides in infected mice. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16: 1546-62.

Krupka I, Straubinger RK. Lyme borreliosis in dogs and cats: background, diagnosis, treatment and prevention of infections with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2010; 40: 1103-19.

Krupka I, Bechtel M, Loehnert-Thiel U, Eppendorf R, Straubinger RK (2012) Borreliose: Möglichkeiten und Perspektiven der Diagnostik. In: 6. Leipziger Tierärztekongress. Leipziger Blaue Hefte, Leipzig, Germany. 319

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.

Kybicová K, Schánilec P, Hulínská D, Uherková L, Kurzová Z, Spejchalová S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2009; 9: 655-61.

Laus F, Veronesi F, Passamonti F, Paggi E, Cerquetella M, Hyatt D, Tesei B, Fioretti DP. Prevalence of tick borne pathogens in horses from Italy. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2013; 75: 715-20.

Le Fleche A, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; 47: 921-5.

Lee S-H, Yun S-H, Choi E, Park Y-S, Lee S-E, Cho G-J, Kwon O-D, Kwak D. Serological detection of *Borrelia burgdorferi* among horses in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 2016; 54: 97.

Lemieux JE, Huang W, Hill N, Cerar T, Freimark L, Hernandez S, Luban M, Maraspin V, Bogovič P, Ogrinc K, Ruzič-Sabljič E, Lapierre P, Lasek-Nesselquist E, Singh N, Iyer R, Liveris D, Reed KD, Leong JM, Branda JA, Steere AC, Wormser GP, Strle F, Sabeti PC, Schwartz I, Strle K. Whole genome sequencing of human *Borrelia burgdorferi* isolates reveals linked blocks of accessory genome elements located on plasmids and associated with human dissemination. *PLoS Pathog* 2023; 19: e1011243.

Leschnik M, Feiler A, Duscher GG, Joachim A. Effect of owner-controlled acaricidal treatment on tick infestation and immune response to tick-borne pathogens in naturally infested dogs from Eastern Austria. *Parasites & Vectors* 2013; 6: 62.

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. *Clinical and Vaccine Immunology* 2010; 17: 828-35.

Levin JM, Nelson JA, Segreti J, Harrison B, Benson CA, Strle F. In vitro susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37: 1444-6.

Levy SA. Use of a C6 ELISA test to evaluate the efficacy of a whole-cell bacterin for the prevention of naturally transmitted canine *Borrelia burgdorferi* infection. *Veterinary Therapeutics* 2002; 3: 420-4.

Liang FT, Alvarez AL, Gu Y, Nowling JM, Ramamoorthy R, Philipp MT. An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology* 1999a; 163: 5566-73.

Liang FT, Steere AC, Marques AR, Johnson BJ, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 1999b; 37: 3990-6.

Liang FT, Philipp MT. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1999; 67: 6702-6.

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. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 4160-6.

Liang FT, Jacobs MB, Bowers LC, Philipp MT. An immune evasion mechanism for spirochetal persistence in Lyme borreliosis. *The Journal of Experimental Medicine* 2002a; 195: 415-22.

Liang FT, Nelson FK, Fikrig E. Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *The Journal of Experimental Medicine* 2002b; 196: 275-80.

Liang FT, Yan J, Mbow ML, Sviat SL, Gilmore RD, Mamula M, Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infection and Immunity* 2004; 72: 5759-67.

Liebisch G, Assmann G, Liebisch A. Infektion mit *Borrelia burgdorferi* sl als Krankheitsursache der Lyme-Borreliose bei Pferden in Deutschland. *Der Praktische Tierarzt* 1999; 80: 498-516.

Lin T, Oliver JH, Jr., Gao L, Kollars TM, Jr., Clark KL. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the southern United States based on restriction fragment length polymorphism and sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 2500-7.

Lin T, Oliver JH, Jr., Gao L. Genetic diversity of the outer surface protein C gene of southern *Borrelia* isolates and its possible epidemiological, clinical, and pathogenetic implications. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 2572-83.

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

Lissman BA, Bosler EM, Camay H, Ormiston BG, Benach JL. Spirochete-associated arthritis (Lyme disease) in a dog. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 1984; 185: 219-20.

Little SE, Heise SR, Blagburn BL, Callister SM, Mead PS. Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends in Parasitology* 2010; 26: 213-8.

Littman MP. Canine borreliosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2003; 33: 827-62.

Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2006; 20: 422-34.

Littman MP, Gerber B, Goldstein RE, Labato MA, Lappin MR, Moore GE. ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2018; 32: 887-903.

Lommano E, Bertaiola L, Dupasquier C, Gern L. Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology* 2012; 78: 4606-12.

Luft BJ, Mudri S, Jiang W, Dattwyler RJ, Gorevic PD, Fischer T, Munoz P, Dunn JJ, Schubach WH. The 93-kilodalton protein of *Borrelia burgdorferi*: An immunodominant protoplasmic cylinder antigen. *Infection and Immunity* 1992; 60: 4309-21.

Magnarelli LA, Anderson JF, Schreier AB, Ficke CM. Clinical and serologic studies of canine borreliosis. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 1987; 191: 1089-94.

Magnarelli LA, Anderson JF, Shaw E, Post JE, Palka FC. Borreliosis in equids in northeastern United States. *American Journal of Veterinary Research* 1988; 49: 359.

Magnarelli LA, Anderson JF, Levine HR, Levy SA. Tick parasitism and antibodies to *Borrelia burgdorferi* in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990; 197: 63-6.

Magnarelli LA, Flavell RA, Padula SJ, Anderson JF, Fikrig E. Serologic diagnosis of canine and equine borreliosis: Use of recombinant antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35: 169-73.

Magnarelli LA, IJdo JW, Andel AEV, Wu C, Padula SJ, Fikrig E. Serologic confirmation of *Ehrlichia equi* and *Borrelia burgdorferi* infections in horses from the northeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2000; 217: 1045-50.

Mali S, Mitchell M, Havis S, Bodunrin A, Rangel J, Olson G, Widger WR, Bark SJ. A Proteomic Signature of Dormancy in the Actinobacterium *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol* 2017; 199

Mandel NS, Senker EG, Bosler EM, Schneider EM. Intrathecal production of *Borrelia-burgdorferi*-specific antibodies in a dog with central-nervous-system Lyme borreliosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1993; 15: 581-6.

Manion TB, Khan MI, Dinger J, Bushmich SL. Viable *Borrelia burgdorferi* in the urine of two clinically normal horses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1998; 10: 196-9.

Mannelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: Transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiology Reviews* 2012; 36: 837-61.

Marangoni A, Moroni A, Accardo S, Cevenini R. *Borrelia burgdorferi* VlsE antigen for the serological diagnosis of Lyme borreliosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2008; 27: 349-54.

Maraspin V, Ruzic-Sabljić E, Strle F. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 1177.

Marconi RT, Liveris D, Schwartz I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: Phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia*

andersonii sp. nov.) isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2427-34.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75: 5410-6.

Margos G, Hojgaard A, Lane RS, Cornet M, Fingerle V, Rudenko N, Ogden N, Aanensen DM, Fish D, Piesman J. Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2010; 1: 151-8.

Margos G, Vollmer SA, Ogden NH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11: 1545-63.

Margos G, Wilske B, Sing A, Hizo-Teufel C, Cao WC, Chu C, Scholz H, Straubinger RK, Fingerle V. *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2013; 63: 4284-8.

Markowicz M, Ladstatter S, Schotta AM, Reiter M, Pomberger G, Stanek G. Oligoarthritis caused by *Borrelia bavariensis*, Austria, 2014. *Emerging Infectious Diseases* 2015; 21: 1052-4.

Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: Advances and challenges. *Infectious Disease Clinics* 2015; 29: 295-307.

Masuzawa T, Komikado T, Iwaki A, Suzuki H, Kaneda K, Yanagihara Y. Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *FEMS Microbiology Letters* 1996a; 142: 77-83.

Masuzawa T, Yanagihara Y, Fujita H. A case of Lyme borreliosis which was suspected to be caused by *Borrelia japonica* infection in Shizuoka, Japan. *Kansenshogaku Zasshi* 1996b; 70: 264-7.

Masuzawa T, Takada N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishiguro F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2001; 51: 1817-24.

Maurizi L, Marie JL, Aoun O, Courtin C, Gorsane S, Chal D, Davoust B. Seroprevalence survey of equine Lyme borreliosis in France and in sub-Saharan Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2010; 10: 535-7.

May K (2009) Enzym-Immunoassay und Western Blot zum Nachweis von Antikörpern gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato bei gesunden Pferden. University of Zurich

McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 2018; 6

Meersschaert C, Cerri S, Pitel P-H, De Waele V, Hendrickx G, Amory H (2016) Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* in horses in the southern part of Belgium: A “one health” driven study. AESA congress. Liège, Belgium

Meeus P, Johnson J, Wagner B (2012) Antimicrobial activity of cefovecin (Convenia®) against *Borrelia burgdorferi* and its impact on early Lyme Borreliosis in dogs, in Proceedings. 30th ACVIM Forum 2012

Miraglia CM. A Review of the Centers for Disease Control and Prevention's Guidelines for the Clinical Laboratory Diagnosis of Lyme Disease. *J Chiropr Med* 2016; 15: 272-80.

Montgomery RR, Lusitani D, de Boisfleury Chevance A, Malawista SE. Human

phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. The Journal of Infectious Diseases 2002; 185: 1773-9.

Moody KD, Barthold SW, Terwilliger GA, Beck DS, Hansen GM, Jacoby RO. Experimental chronic Lyme borreliosis in Lewis rats. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1990; 42: 165-74.

Moody KD, Terwilliger GA, Hansen GM, Barthold SW. Experimental *Borrelia burgdorferi* infection in *Peromyscus leucopus*. Journal of Wildlife Diseases 1994; 30: 155-61.

Müller I, Khanakah G, Kundi M, Stanek G. Horses and *Borrelia*: immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding School in Vienna. International Journal of Medical Microbiology 2002; 291 Suppl 33: 80-7.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 263-73

Munderloh UG, Kurtti TJ, Johnson RC, Ahlstrand GG. Colony formation by Lyme disease spirochetes. Annals of the New York Academy of Sciences 1988; 539: 404-6.

Munderloh UK, Kurtti TJ. The ABCs of Lyme disease spirochaetes in ticks. The Lancet 2005; 366: 962-4.

Murphy K, Janeway CAJ, Travers P, Walport M. The Immunologist's Toolbox. In: Janeway's Immunobiology New York: Garland Science 2012: 723-5.

Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Bittker S, Cooper D, Goldberg N, McKenna D, Wormser GP. Failure to isolate *Borrelia burgdorferi* after antimicrobial therapy in culture-documented Lyme borreliosis associated with

erythema migrans: Report of a prospective study. *The American Journal of Medicine* 1993; 94: 583-8.

Nordberg M, Forsberg P, Nyman D, Skogman BH, Nyberg C, Ernerudh J, Eliasson I, Ekerfelt C. Can ELISPOT be applied to a clinical setting as a diagnostic utility for neuroborreliosis? *Cells* 2012; 1: 153-67.

Nunes M, Parreira R, Carreira T, Inacio 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 and Tick-borne Diseases* 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*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2004; 11: 458-62.

Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 670-5.

Okeyo M, Hartberger C, Margos G, Straubinger RK, Sing A, Fingerle V. Comparison of methods for economic and efficient tick and *Borrelia* DNA purification. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2019; 10: 1041-5.

Pachner AR, Delaney E, O'Neill T, Major E. Inoculation of nonhuman primates with the N40 strain of *Borrelia burgdorferi* leads to a model of Lyme neuroborreliosis faithful to the human disease. *Neurology* 1995; 45: 165-72.

Padula SJ, Dias F, Sampieri A, Craven RB, Ryan RW. Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 1733-8.

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. *Journal of Clinical Investigation* 2004b; 113: 220-30.

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

Pantchev N, Pluta S, Huisinga E, Nather S, Scheufelen M, Vrhovec MG, Schweinitz A, Hampel H, Straubinger RK. Tick-borne diseases (Borreliosis, Anaplasmosis, Babesiosis) in German and Austrian dogs: Status quo and review of distribution, transmission, clinical findings, diagnostics and prophylaxis. *Parasitology Research* 2015; 114 Suppl 1: S19-54.

Parte AC, Sardà Carbasse J, P. M-KJ, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020; 70: 5607-12.

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

Pecoraro HL, Felipe MJB, Miller AD, Divers TJ, Simpson KW, Guyer KM, Duhamel GE. Neuroborreliosis in a horse with common variable

immunodeficiency. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2019; 31: 241-5.

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. *Journal of Infectious Diseases* 2001; 184: 870-8.

Piesman J, Mather TN, Sinsky RJ, Spielman A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *Journal of Clinical Microbiology* 1987; 25: 557-8.

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

Pollack RJ, Telford SR, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 1251-5.

Porcella SF, Fitzpatrick CA, Bono JL. Expression and immunological analysis of the plasmid-borne *mlp* genes of *Borrelia burgdorferi* strain B31. *Infection and Immunity* 2000; 68: 4992-5001.

Post JE. Lyme disease in large animals. *New Jersey Medicine: The journal of the Medical Society of New Jersey* 1990; 87: 575.

Postic D, Ras NM, Lane RS, Hendson M, Baranton G. Expanded diversity among californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (Formerly *Borrelia* Group DN127). *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36: 3497-504.

Postic D, Garnier M, Baranton G. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *International Journal of Medical Microbiology* 2007; 297:

263-71.

Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 1991; 10: 1076-9.

Preyß-Jägeler C, Hartmann K, Dorsch R. Changes in renal parameters and their association with subclinical vector-borne infections in Bernese Mountain dogs. *BMC Veterinary Research* 2020; 16: 1-8.

Priem S, Krause A. Labordiagnostik der Lyme Borreliose. In: Lyme Borreliose. Krause AB, ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1999: 17-24.

Priest HL, Irby NL, Schlafer DH, Divers TJ, Wagner B, Glaser AL, Chang YF, Smith MC. Diagnosis of *Borrelia*-associated uveitis in two horses. *Veterinary Ophthalmology* 2012; 15: 398-405.

Pritt BS, Mead PS, Johnson DKH, Neitzel DF, Respicio-Kingry LB, Davis JP, Schiffman E, Sloan LM, Schriefer ME, Replogle AJ, Paskewitz SM, Ray JA, Bjork J, Steward CR, Deedon A, Lee X, Kingry LC, Miller TK, Feist MA, Theel ES, Patel R, Irish CL, Petersen JM. Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 2016; 16: 556-64.

Ramamoorthy R, Scholl-Meecker D. *Borrelia burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. *Infect Immun* 2001; 69: 2739-42.

Rasiah C, Rauer S, Gassmann GS, Vogt A. Use of a hybrid protein consisting of the variable region of the *Borrelia burgdorferi* flagellin and part of the 83-kDa protein as antigen for serodiagnosis of Lyme disease. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1011-7.

Rhodes DV, Earnhart CG, Mather TN, Meeus PF, Marconi RT. Identification of *Borrelia burgdorferi* ospC genotypes in canine tissue following tick infestation: Implications for Lyme disease vaccine and diagnostic assay design. *The Veterinary Journal* 2013; 198: 412-8.

Richter D, Postic D, Sertour N, Livey I, Matuschka FR, Baranton G. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2006; 56: 873-81.

Robert Koch Institut. Lyme-Borreliose. 2019: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_LymeBorreliose.html;jsessionid=E0F2254F5078F73E988D2A1E2611247A.internet081#doc2398672bodyText3. 2020/06/02.

Roberts WC, Mullikin BA, Lathigra R, Hanson MS. Molecular analysis of sequence heterogeneity among genes encoding decorin binding proteins A and B of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection and Immunity* 1998; 66: 5275-85.

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.

Rogovskyy AS, Casselli T, Tourand Y, Jones CR, Owen JP, Mason KL, Scoles GA, Bankhead T. Evaluation of the importance of VlsE antigenic variation for the enzootic cycle of *Borrelia burgdorferi*. *PLOS ONE* 2015; 10: e0124268.

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

Rosa PA, Tilly K, Stewart PE. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3: 129-43.

Rössler D, Eiffert H, Jauris-Heipke S, Lehnert G, Preac-Mursic V, Teepe J, Schlott T, Soutschek E, Wilske B. Molecular and immunological characterization of the p83/100 protein of various *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Medical Microbiology and Immunology* 1995; 184: 23-32.

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 2009a; 47: 134-41.

Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 2009b; 47: 3875-80.

Samuels DS, Radolf JD (2010) *Borrelia: Molecular biology, host interaction and pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. 548 pp.

Schánilec P, Kybicová K, Agudelo CF, Treml F. Clinical and diagnostic features in three dogs naturally infected with *Borrelia* spp. *Acta Veterinaria Brunensis* 2010; 79: 319-27.

Schönberg A, Schmidt K, Kässbohrer A. Eine durch Zecken übertragene Zoonose: Lyme Borreliose. *Bundesgesundheitsblatt* 1989; 32: 190-3.

Schönert S (2006) Untersuchungen zum direkten und indirekten Nachweis des Erregers der Lyme-Borreliose beim Pferd unter qualitätssichernden Aspekten. Freie Universität Berlin, Berlin

Schönert S, Gall Y, Grabner A. Lyme-Borreliose beim Pferd – vergleichende Diagnostik und Fallbeispiel eines Ponys mit Meningitis. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere* 2008a; 36: S49-S53.

Schönert S, Gall Y, Grabner A. Lyme borreliosis in the horse – test evaluation and

case report of a pony with meningitis. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2008b; 36: S49-S53.

Schulte-Spechtel U, Lehnert G, Liegl G, Fingerle V, Heimerl C, Johnson BJ, Wilske B. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and a DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of early neuroborreliosis. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41: 1299-303.

Schütt C, Bröker B. In vitro-Methoden. In: Grundwissen Immunologie: Springer 2011: 122-44.

Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. Proceedings of the National Academy of Sciences 1995; 92: 2909-13.

Schwan TG, Piesman J. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38: 382-8.

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

Shin SJ, Chang Y-F, Jacobson RH, Shaw E, Lauderdale T-L, Appel MJ, 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.

Siegmund-Schultze N. Zweifelhafte Borreliose-Tests. Deutsches Ärzteblatt 2007; 1891: 104.

Simpson WJ, Schrupf ME, Schwan TG. Reactivity of human Lyme borreliosis

sera with a 39-kilodalton antigen specific to *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 1329-37.

Simpson WJ, Schrumf ME, Hayes SF, Schwan TG. Molecular and immunological analysis of a polymorphic periplasmic protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29: 1940-8.

Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *The Journal of Parasitology* 2003; 89: 194-6.

Skotarczak B, Wodecka B. Identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies inducing Lyme disease in dogs from Western Poland. *Acta Veterinaria Hungarica* 2005; 53: 13-21.

Skotarczak B. Why are there several species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in dogs and humans? *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 23: 182-8.

Speck S, Reiner B, Wittenbrink MM. Isolation of *Borrelia afzelii* from a dog. *Veterinary Record* 2001; 149: 19-20.

Speck S, Reiner B, Streich WJ, Reusch C, Wittenbrink MM. Canine borreliosis: A laboratory diagnostic trial. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 132-41.

Springer A, Raulf MK, Fingerle V, Strube C. *Borrelia* prevalence and species distribution in ticks removed from humans in Germany, 2013-2017. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2020; 11: 101363.

Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection* 2011; 17: 487-93.

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

461-73.

Stanek G. Lyme borreliosis, ticks and *Borrelia* species. Wiener klinische Wochenschrift 2018; 130: 459-62.

Steere AC. Lyme disease. The New England Journal of Medicine 2001; 345: 115-25.

Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. The Journal of Clinical Investigation 2004; 113: 1093-101.

Steere AC, McHugh G, Damle N, Sikand VK. Prospective study of serologic tests for Lyme disease. Clinical Infectious Diseases 2008; 47: 188-95.

Steffen, Hirsch. Diagnostik der Lyme-Borreliose. Therapeutische Umschau 2005; 62: 737-44.

Stevenson B, Schwan TG, Rosa PA. Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 1995; 63: 4535-9.

Stevenson B, Bono JL, Schwan TG, Rosa PA. *Borrelia burgdorferi* Erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria. Infection and Immunity 1998; 66: 2648-54.

Stewart PE, Byram R, Grimm D, Tilly K, Rosa PA. The plasmids of *Borrelia burgdorferi*: Essential genetic elements of a pathogen. Plasmid 2005; 53: 1-13.

Straubinger RK, Chang YF, Jacobson RH, Appel MJ. 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, Summers BA, Chang Y-F, Appel MJ. Persistence of *Borrelia*

burgdorferi in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. Journal of Clinical Microbiology 1997a; 35: 111-6.

Straubinger RK, Straubinger AF, Härter L, Jacobson RH, Chang Y-F, Summers BA, Erb HN, Appel MJ. *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 1997b; 65: 1273-85.

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

Straubinger RK, Straubinger AF, Summers BA, Erb HN, Harter L, Appel MJ. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. Infection and Immunity 1998b; 66: 247-58.

Straubinger RK. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. Journal of Clinical Microbiology 2000; 38: 2191-9.

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

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

Straubinger RK. Spirochäten. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Selbitz H-J TU, Valentin-Weigand P, ed. Stuttgart, Germany: Enke Verlag 2015: 6.

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. *Applied and Environmental Microbiology* 2017; 83

Stupica D, Lusa L, Maraspin V, Bogovic P, Vidmar D, O'Rourke M, Traweger A, Livey I, Strle F. Correlation of culture positivity, PCR positivity, and burden of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in skin samples of erythema migrans patients with clinical findings. *PLOS ONE* 2015; 10: e0136600.

Sturgeon CM, Viljoen A. Analytical error and interference in immunoassay: Minimizing risk. *Annals of Clinical Biochemistry* 2011; 48: 418-32.

Talaska T. Diagnostische Methoden bei Borrelien Infektionen – Übersicht. In: Für die Praxis: Lyme-Borreliose. . Talaska T, ed.: 1998: 48-59.

Topfer KH, 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. *Vaccine* 2007; 25: 314-26.

Tsachev I, Baymakova M, Pantchev N. Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* infections in horses: First report from Northern Bulgaria - Short communication. *Acta Veterinaria Hungarica* 2019; 67: 197-203.

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

Valentine-Thon E, Ilsemann K, Sandkamp M. A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007; 57: 27-34.

Verma A, Brissette CA, Bowman A, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* BmpA is a

laminin-binding protein. *Infection and Immunity* 2009; 77: 4940-6.

Veronesi F, Laus F, Passamonti F, Tesei B, Fioretti DP, Genchi C. Occurrence of *Borrelia lusitaniae* infection in horses. *Veterinary Microbiology* 2012; 160: 535-8.

Volkman DJ, Luft BJ, Gorevic PD, Schultz J, Padovano L. Characterization of an immunoreactive 93-kDa core protein of *Borrelia burgdorferi* with a human IgG monoclonal antibody. *The Journal of Immunology* 1991; 146: 3177-82.

Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31: 507-20.

von Baehr V, Doebis C, Volk H-D, von Baehr R. The Lymphocyte Transformation Test for *Borrelia* detects active Lyme borreliosis and verifies effective antibiotic treatment. *The Open Neurology Journal* 2012; 6: 104.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb HN, Lu Z, Gröhn Y. Development of a multiplex assay for the detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in horses and its validation using Bayesian and conventional statistical methods. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011a; 144: 374-81.

Wagner B, Freer H, Rollins A, Erb HN. A fluorescent bead-based multiplex assay for the simultaneous detection of antibodies to *B. burgdorferi* outer surface proteins in canine serum. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011b; 140: 190-8.

Wagner B, Erb HN. Dogs and horses with antibodies to outer-surface protein C as on-time sentinels for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* in New York State in 2011. *Preventive Veterinary Medicine* 2012; 107: 275-9.

Wagner B, Goodman LB, Rollins A, Freer HS. Antibodies to OspC, OspF and C6 antigens as indicators for infection with *Borrelia burgdorferi* in horses. *Equine Veterinary Journal* 2013; 45: 533-7.

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 Veterinary Research* 2015; 11: 163.

Wang G, van Dam AP, Le Fleche A, Postic D, Peter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology* 1997; 47: 926-32.

Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12: 633-53.

Wang G. Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2002; 2: 223-31.

Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1987; 37: 463-4.

Wienecke R, Neubert U, Volkenandt M. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* in formalin-fixed, paraffin-embedded lesions of Lyme disease. *Journal of Cutaneous Pathology* 1993; 20: 385-8.

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

Wilczek CK (2023) Charakterisierung der humoralen Immunantwort von Hunden nach Impfung gegen die Lyme-Borreliose anhand zwei verschiedener

Impfstrategien. In: Veterinärwissenschaftliches Department. Ludwig-Maximilians-Universität, Munich

Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G. Antigenic heterogeneity of European *Borrelia burgdorferi* strains isolated from patients and ticks. *Lancet* 1985; 1: 1099.

Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kühbeck R, Barbour AG, Kramer M. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1988; 539: 126-43.

Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Liegl G, Gueye W. Detection of IgM and IgG antibodies to *Borrelia burgdorferi* using different strains as antigen. *Zentralblatt für Bakteriologie* 1989; 18: 299-309.

Wilske B, Preac-Mursic V, Fuchs R, Schierz G. Diagnostik der Lyme-Borreliose. *Diagnose & Labor* 1990; 40: 24-36.

Wilske B, Barbour AG, Bergstrom S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Research in Microbiology* 1992; 143: 583-96.

Wilske B, Preac-Mursic V, Gobel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 1993a; 31: 340-50.

Wilske B, Preac-Mursic V. Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. In: *Aspects of Lyme borreliosis*: Springer 1993: 267-99.

Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, Schwab E, Will G, Wanner G. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 1993b; 61: 2182-91.

Wilske B, Fingerle V, Herzer P, Hofmann A, Lehnert G, Peters H, Pfister HW, Preac-Mursic V, Soutschek E, Weber K. Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. Comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Microbiol Immunol* 1993c; 182: 255-70.

Wilske B. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2003; 3: 215-27.

Wilske B, Fingerle V. Lyme-Borreliose Diagnostik. *Mikrobiologie* 2005; 15: 209-20.

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

Winslow C, Coburn J. Recent discoveries and advancements in research on the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *F1000Res* 2019; 8

Wodecka B. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in North-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2003; 10: 171-8.

Wodecka B, Rymaszewska A, Sawczuk M, Skotarczak B. Detectability of tick-borne agents DNA in the blood of dogs, undergoing treatment for borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2009; 16: 9-14.

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, Schwartz I. Antibiotic treatment of animals infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 22: 387-95.

Wormser GP, O'Connell S. Treatment of infection caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Expert Review of anti-infective Therapy 2011; 9: 245-60.

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.

Yang X, Goldberg MS, Popova TG, Schoeler GB, Wikel SK, Hagman KE, Norgard MV. Interdependence of environmental factors influencing reciprocal patterns of gene expression in virulent *Borrelia burgdorferi*. Mol Microbiol 2000; 37: 1470-9.

Yang XF, Pal U, Alani SM, Fikrig E, Norgard MV. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. J Exp Med 2004; 199: 641-8.

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. Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene VlsE involves cassette-specific, segmental gene conversion. Infection and Immunity 1998a; 66: 3698-704.

Zhang JR, Norris SJ. Kinetics and *in vivo* induction of genetic variation of VlsE in *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 1998b; 66: 3689-97.

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

IX. ANHANG

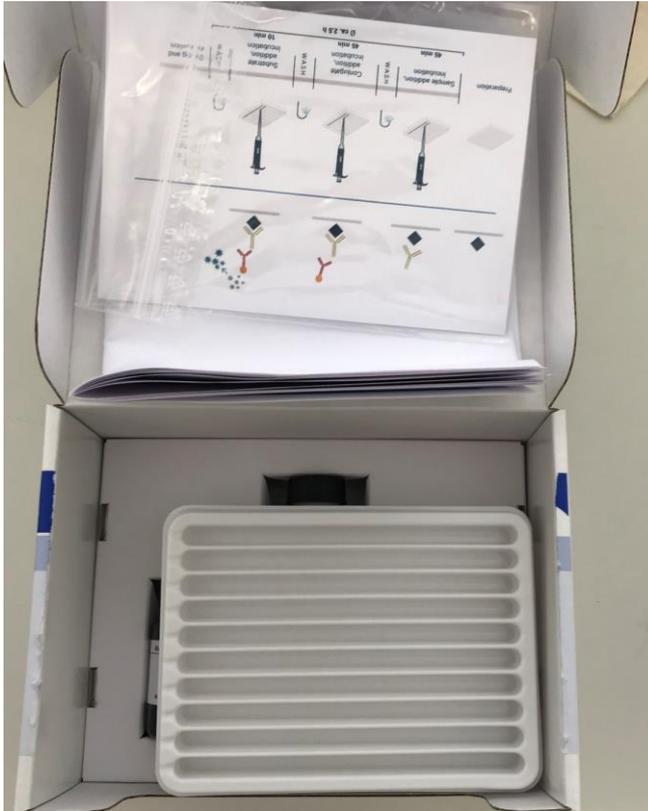


Abbildung A 1: Inhalt des Testkits des LIA A

Zu sehen sind die Inkubationswannen und die Verpackung der Streifen.

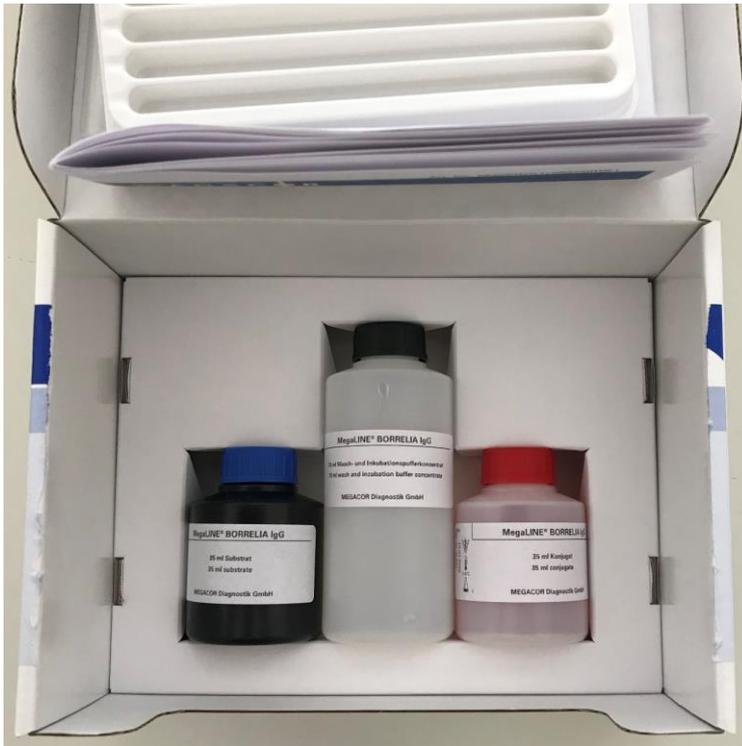


Abbildung A 2: Inhalt des Testkits des LIA A

Zu sehen sind von links nach rechts das Substrat, der Wasch-/Probenpuffer und der Sekundärantikörper.



Abbildung A 3: Inhalt des Testkits des LIA B

Zu sehen sind zwei Verdünnungs-/Waschpuffer (weißer Deckel), Substrat (rechts daneben), Cut-Off-Kontrolle Hund (kleines Fläschchen mit dunkelblauem Deckel) und anti-dog-IgG (kleines Fläschchen mit hellblauem Deckel) sowie der Auswertungsbogen.



Abbildung A 4: Inhalt des Testkits des LIA B für Pferdeseren

Zu sehen sind Cut-Off-Kontrolle Pferd (kleines Fläschchen mit dunkelrotem Deckel) und anti-horse-IgG (kleines Fläschchen mit hellrotem Deckel) sowie der Bogen zur Auswertung für equine Proben.

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 13, 2024

This Agreement between LMU Munich -- Sophie Doff ("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	5767071267080
License date	Apr 13, 2024
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	2
Would you like a high resolution image with your order?	no

Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title of new work	Vergleichender Nachweis von Antikörpern gegen Erreger des <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato-Komplexes in caninen und equinen Seren mit zwei Line-Immunoassays
Institution name	LMU Munich
Expected presentation date	Mar 2025
Portions	Figures 2,4
Requestor Location	LMU Munich Sonnenstraße 14 Oberschleißheim, 85764 Germany Attn: LMU Munich
Total	0.00 EUR

Abbildung A 5: Nutzungsrecht für Abbildungen 4 und 5

X. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Straubinger bedanken. Zu jedem Zeitpunkt konnte ich auf seine Unterstützung sowie hervorragende fachliche Betreuung zählen.

Auch all meinen Kollegen am Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie möchte ich meinen Dank aussprechen, insbesondere Stephanie, die mich in allen Belangen stets unterstützt hat und immer ein offenes Ohr hatte. Ein riesengroßer Dank geht an Jasmin, in der ich nicht nur eine liebe Kollegin hatte, sondern auch eine gute Freundin gefunden habe. Ohne sie wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie fertig geworden.

Meinen Eltern möchte ich von ganzem Herzen danken, für ihre Geduld, ihren guten Zuspruch, ihre Unterstützung während meines Studiums und der Zeit dieser Dissertation, sowie das Babysitten. Meinem Vater insbesondere vielen Dank für die Abende und Nachmittage, die er mit Korrekturlesen verbracht hat.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Schwiegereltern, Geschwister und Schwager, die so viele Stunden auf die Kinder aufgepasst haben, damit ich in Ruhe schreiben konnte.

Meiner besten Freundin Mellie möchte ich für ihren guten Zuspruch, ihre Unterstützung und ihr offenes Ohr in jeder Lebenslage danken.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Mann Korbinian danken. Du hast immer an mich geglaubt und mir immer Mut zugesprochen, hast mich motiviert und mich getröstet, wenn es mir nicht gut ging. Ohne dich hätte ich das alles nie geschafft.